

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

ÉCOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTÉ"
De Lille Nord de France

Année 2011

**Effets d'une dénutrition maternelle prénatale sur la régulation de
l'homéostasie énergétique chez la descendance mâle adulte :
focus sur l'hypothalamus et le tissu adipeux**

THÈSE DE DOCTORAT
N° d'ordre : 40626

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Marie-Amélie LUKASZEWSKI

Le 15 Novembre 2011 devant le jury ci-dessous

Président	Dr Pierre-Yves Risold, Université de Franche-Comté
Rapporteurs	Pr Mohammed Taouis, Université Paris Sud XI Dr Brigitte Reusens, Université Catholique de Louvain
Examineur	Pr Anne Muhr-Tailleux, Université Lille Nord de France
Directeur	Pr Christophe Breton, Université Lille Nord de France
Co-directeur	Pr Didier Vieau, Université Lille Nord de France

À la mémoire d'Édith et Stéfán Lukaszewski

La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre.

Albert Einstein

Remerciements

La thèse est ponctuée de moments riches en émotions, dont vous avez tous été les principaux acteurs. J'espère exprimer au mieux mes sentiments dans ces quelques lignes.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Reusens, le Pr Muhr-Tailleux, le Pr Taouis ainsi que le Dr Risold de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Christophe et Didier, merci de m'avoir accueillie dans l'équipe, encadrée et soutenue durant ces quatre dernières années. Christophe, merci de m'avoir appris à synthétiser mes idées, moi qui m'éparpille si facilement. Didier, je te remercie pour les conversations scientifiques que nous avons eues au début, pour m'avoir montré qu'on peut toujours se dépasser car la science n'a pas de limite.

Isabelle, grande prêtresse des colorations histologiques, trouve dans ces quelques mots toute l'estime que je te porte. Tu as toujours trouvé le temps de t'impliquer dans mes manips, tu m'as donné la force d'affronter mon premier cours, tu m'as beaucoup fait rire et surtout tu m'as appris que le sucre peut sauver des vies (je ne m'en remettrai jamais). Tu as toujours répondu présente, dans les bons comme les mauvais moments. Pour ça et bien d'autres choses encore, merci.

Christine, notre maman du labo...merci pour tes conseils scientifiques, ton écoute, ton enthousiasme débordant et communicatif. J'ai beaucoup apprécié nos conversations pas toujours scientifiques, travailler à tes côtés a été un grand plaisir.

Jean, l'éthique scientifique voudrait que je te remercie pour l'initiation à l'HIS, les coupes au cryostat...les innombrables dépannages d'eau miliQ et de pains de carbo. Mais je préfère te remercier pour m'avoir épaulée dans les moments douloureux de ma vie. Merci d'avoir toujours eu un mouchoir, une oreille et un mot gentil. Merci de m'avoir montré que dans les moments les plus difficiles, il y a toujours une paillette qui scintille à l'horizon.

Merci à Isabelle et Manu de m'avoir initiée aux joies de la qPCR. Je vous remercie pour votre patience et votre aide. Merci à Manu qui a toujours cherché des solutions aux problèmes techniques que j'ai pu rencontrer.

Remerciements

Ouma, merci de m'avoir permis de me perfectionner en dissection. Plus sérieusement, merci d'avoir été la parfaite colloc de bureau, merci pour ta gentillesse, ton soutien, ta bonne humeur et ton rire contagieux. J'ai apprécié chaque moment passé avec toi, et j'espère qu'il y en aura encore bien d'autres.

Merci JS pour ton entrain, ton humour et pour l'intérêt que tu portes au travail de chacun.

Fabien, même si tu as suivi ma dernière année depuis New York, sache que ce fût un très grand plaisir de travailler avec toi. Nos échanges scientifiques, tes éclats de rires et tes *solo a cappella* me manquent. Pour ton soutien et ta franchise, merci.

Merci à Anne, Valérie, Capucine, Geoffrey et Estelle pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur aide. Je tiens tout particulièrement à remercier Anne et Valérie pour leur écoute et leur soutien, la thèse n'aurait pas été la même sans vous.

Merci à Jen qui me supporte depuis 22 longues années. Trouve dans ces quelques lignes toute l'affection et la reconnaissance que je te porte. Tu m'as toujours encouragée et soutenue dans mes choix, tu as été, bien plus que tu ne peux l'imaginer, une alliée de poids durant ces années de thèse pas toujours évidentes.

Marie, malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent, tu es toujours autant présente dans ma vie. Merci pour ton soutien, ton sens de la dérision, merci de m'avoir fait rire aux larmes pour mieux recharger les batteries.

Sophie, merci d'être un bisounours qui met des paillettes dans ma vie. Sache que j'ai beaucoup d'admiration pour la scientifique passionnée que tu deviens.

Merci à mes beaux-parents pour leur présence, leur soutien sans faille et pour toujours avoir une couette, un canapé et un feu de cheminée qui m'attendent.

Un énorme merci à mes parents qui ont toujours cru en moi. Merci de m'avoir permis d'arriver jusqu'ici et de m'avoir soutenue à tous les niveaux. Je vous remercie de m'avoir

Remerciements

appris à ne jamais baisser les bras et qu'avec de la volonté rien est impossible. C'est grâce à vous que mes espoirs de devenir chercheur prennent forme, cette thèse est donc un peu la vôtre.

Laurent, je te remercierai bien d'avoir écouté mes aventures scientifiques, mais nous savons tous les deux que c'est faux...Je te dirais tout simplement merci d'être le meilleur frère du monde entier, de toujours répondre présent, de me soutenir et d'avoir ce super pouvoir de désamorcer n'importe quelle situation par le rire.

Une pensée pour ma Babcia qui, même si elle n'a jamais su ce que je faisais, a toujours pris le temps de me demander « comment ça va à l'école ? ».

Que serait ma vie sans mes gribouilles ? Merci à Ssaussette, Caranelle et Clémentine, également connue sous le nom de « *El poyo loco* », de m'avoir fait d'énormes câlins quand j'en avais besoin. Merci à Carotte, ou plutôt Monsieur Carotte, pour m'avoir fait rire dans les moments plus difficiles. Merci à Nounou, Dexter et Cannelle pour leur soutien si...particulier.

Merci à KoRn, Metallica, Sepultura, Rammstein, Rob Zombi et tant d'autres de m'avoir permis d'évacuer musicalement mon stress et de m'avoir tenu compagnie en manip, surtout le soir.

Sylvain...ton rôle a été capital dans cette thèse. Il m'est difficile de décrire en seulement quelques lignes tout ce que nous avons pu vivre. Nous avons fait le pari un peu fou de partager quotidien et vie de laboratoire. Ces quatre années ont été ponctuées de hauts et de bas et tu as toujours été mes côtés. Jamais je n'aurai pu imaginer meilleur soutien. Je pense que dans ce domaine, on est bien plus fort à deux. Être dans la même situation nous a permis de mieux comprendre l'autre et d'avoir les mots justes. Merci d'être là, d'être toi et d'avoir fait de ma vie ce qu'elle est aujourd'hui.

Des données épidémiologiques indiquent qu'une dénutrition maternelle périnatale (DMP) conduit à un retard de croissance intra-utérin (RCIU) caractérisé par un petit poids de naissance et prédispose la descendance au développement d'un syndrome métabolique (SM) à l'âge adulte. Afin de comprendre les mécanismes potentiellement impliqués dans la mise en place de ce syndrome, nous avons développé un modèle de programmation fœtale chez le rat par restriction alimentaire de 70 % pendant toute la durée de la gestation : le modèle FR30.

Nos travaux ont montré que la DMP contribue à une sensibilité accrue de la descendance mâle au développement de traits du SM. Les rats mâles adultes FR30 présentent une hypertension artérielle modérée, une hyperleptinémie sans phénotype d'obésité, une hypercorticostéronémie, une perturbation de la régulation de la glycémie ainsi qu'une hyperphagie associée à un décalage de la prise de nourriture en phase diurne suggérant une perturbation des rythmes biologiques. Les rats FR30 présentent également des altérations subtiles des projections des neurones hypothalamiques à POMC. L'absence de variation du niveau d'expression de gènes hypothalamiques cibles de la leptine (en particulier NPY et POMC), associée à la diminution de l'expression hypothalamique de son récepteur, laissent supposer un état de résistance à la leptine.

Notre objectif a été ensuite d'identifier les mécanismes tissulaires programmés par la DMP chez la descendance mâle FR30 adulte dans l'hypothalamus et deux dépôts de tissu adipeux blanc. Basé sur la théorie de la programmation fœtale, nous avons tenté d'exacerber les perturbations métaboliques observées et/ou silencieuses sous régime standard en plaçant les rats FR30 sous un régime alimentaire hyperlipidique (HF) dès le sevrage.

Bien que la DMP n'exacerbe pas les traits de SM induits par le régime HF chez la descendance, les rats adultes FR30HF présentent une prise de poids plus importante malgré une absence d'hyperphagie, une masse des dépôts de tissu adipeux rapportée au poids corporel augmentée, un taux de leptine plasmatique plus important et une absence d'augmentation du taux de glucocorticoïdes circulants suite au jeûne. Nous avons montré que le tissu adipeux présente de fortes variations d'expression génique, contrairement à l'hypothalamus qui semble préserver des perturbations géniques. En effet, les taux d'ARNm de la leptine et de son récepteur, de précurseurs de peptides et de leurs récepteurs, de facteurs impliqués dans la lipogenèse et dans la sensibilité aux glucocorticoïdes, ainsi que les mécanismes impliqués dans la sensibilité à la leptine, sont modulés de manière différente en fonction des dépôts chez les rats FR30HF.

Nos travaux suggèrent donc que l'axe hypothalamo-adipocytaire constitue l'une des cibles privilégiées de la programmation fœtale suite à une DMP chez la descendance mâle adulte.

Publications écrites :

1. Articles

Lukaszewski M.A., Mayeur S., Fajardy I., Delahaye F., Dutriez-Casteloot I., Montel V., Dickes-Coopman A., Laborie C., Lesage J., Vieau D., Breton C. *Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male under high-fat diet*. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism. 2011, 301: E548-559.

Guillemot J. *, **Lukaszewski M.A.** *, Montel V., Delahaye F., Mayeur S., Laborie C., Dickes-Coopman A., Dutriez-Casteloot., Lesage J., Breton C., Vieau D. *Influence of prenatal undernutrition on the effects of clozapine and aripiprazole in the adult male rats : relevance to a neurodevelopmental origin of schizophrenia ?* European Journal of Pharmacology. 2011, 667 : 402-409.

Delahaye F., **Lukaszewski M.A.**, Watez J.S., Cisse O., Dutriez-Casteloot I., Laborie C., Lesage J., Breton C. and Vieau D. *Maternal perinatal undernutrition programs a "brown-like" phenotype of gonadal white fat in male rat at weaning*. American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology. 2010, 299 : R101-110.

Breton C., **Lukaszewski M.A.**, Risold P.Y., Enache M., Guillemot J., Rivière G., Delahaye F., Lesage J., Dutriez-Casteloot I., Laborie C., Vieau D. *Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring*. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 2009, 296 : E462-472.

2. Revues

Mayeur S., **Lukaszewski M.A.**, Breton C., Storme L., Junien C., Vieau D., Lesage J. *New insights on BDNF in the feto-placental development*. Médecine & Sciences. (Paris), 2011, 27: 251-252.

Mayeur S., **Lukaszewski M.A.**, Breton C., Storme L., Vieau D., Lesage J. *Do neurotrophins regulate the feto-placental development?* Medical Hypotheses, 2011, 76: 726-728.

3. Chapitre de livre

Vieau D., Mayeur S., **Lukaszewski M.A.**, Delahaye F., Dutriez-Casteloot I., Laborie C., Deloof S., Lesage J., Breton C. *Perinatal undernutrition and brain-derived neurotrophic factor*. In International Handbook of Behavior, Diet and Nutrition (Preedy V.R., eds.), Springer.

Communications affichées :

Cisse O., Fajardy I., Delahaye F., **Lukaszewski M.A.**, Montel V., Dickes-Coopman A., Moitrot E., Vieau D., Laborie C. *Impact de la programmation nutritionnelle et d'un régime hyperlipidique sur la transmission du risque du diabète chez le rat*. ALFEDIAM. Société Francophone du Diabète (SFD) – Geneva, Switzerland – Mars 2011.

Mayeur S., Lancel S., **Lukaszewski M.A.**, Duban-Deweere S., Bastide B., Junien C., Cecchelli R., Nevière R., Storme L., Vieau D., Lesage J. *Research of placental markers of intra-uterine growth retardation by proteomic analysis in rat*. 1st E.G.I.D. symposium “Diabetes research breakthroughs: the vintage 2010” – Lille, France – 13 Octobre 2010.

Lukaszewski M.A., Delahaye F., Mayeur S., Fajardy I., Dutriez-Casteloot I., Montel V., Dickes-Coopman A., Laborie C., Lesage J., Vieau D., Breton C. *Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring on a high-fat diet*. 1st E.G.I.D. symposium “Diabetes research breakthroughs: the vintage 2010” – Lille, France – 13 Octobre 2010.

Lukaszewski M.A., Delahaye F., Fajardy I., Dutriez-Casteloot I., Montel V., Dickes-Coopman A., Laborie C., Lesage J., Vieau D., Breton C. *Effets d'une dénutrition maternelle prénatale sur la régulation de l'homéostasie énergétique chez la descendance mâle adulte : focus sur le dialogue entre le tissu adipeux et l'hypothalamus*. 10^{ème} journée André Verbert, colloque annuel des Doctorants – Lille, France – 15 Septembre 2010.

Guillemot J., **Lukaszewski M.A.**, Delahaye F., Mayeur S., Montel V., Dickes-Coopman A., Laborie C., Lesage J., Breton C., Vieau D. *Influence of prenatal undernutrition on the effects of clozapine and aripiprazole in the adult male rats : Relevance to a neurodevelopmental origin of schizophrenia ?* The 7th International Congress of Neuroendocrinology – Rouen, France – du 11 au 15 Juillet 2010.

Delahaye F., **Lukaszewski M.A.**, Watez J.S., Cisse O., Dutriez-Casteloot I., Laborie C., Lesage J., Breton C. and Vieau D. *Maternal perinatal undernutrition programs a "brown-like" phenotype of gonadal white fat in male rat at weaning*. The 7th International Congress of Neuroendocrinology – Rouen, France – du 11 au 15 Juillet 2010.

Mayeur S., Duparc T., Knauf C., Colom A., Delahaye F., **Lukaszewski M.A.**, Watez J.S., Breton C., Storme L., Valet P., Vieau D., Lesage J. *Ontogeny of apelin and its receptor in the rat : Focus on the feto-placental unit and modulation by maternal undernutrition in growth-restricted male offspring*. The 7th International Congress of Neuroendocrinology – Rouen, France – du 11 au 15 Juillet 2010.

Lukaszewski M.A., Risold P.Y., Enache M., Guillemot J., Rivière G., Delahaye F., Lesage J., Dutriez-Casteloot I., Laborie C., Vieau D., Breton C. *Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring*. IUGR and metabolic programming – Beauvais, France – 23 Mars 2009.

Introduction.....	- 23 -
I. Hypothèse de l'origine fœtale de pathologies chroniques chez l'adulte	- 25 -
A. Évidences épidémiologiques	- 25 -
II. Notion de programmation fœtale	- 33 -
A. Le retard de croissance intra-utérin	- 33 -
B. Concept de programmation fœtale.....	- 37 -
III. Régulation de l'homéostasie énergétique	- 57 -
A. Schéma général.....	- 57 -
B. Régulation de l'homéostasie énergétique par le système nerveux central.....	- 61 -
C. La régulation de l'homéostasie énergétique par la périphérie.....	- 74 -
IV. Le tissu adipeux : un tissu endocrinien.....	- 87 -
A. Généralités.....	- 87 -
B. Les différents types cellulaires du tissu adipeux blanc	- 91 -
C. La tissu adipeux blanc : lieu de synthèse et stockage des lipides.....	- 92 -
D. L'adipogenèse.....	- 93 -
E. Le tissu adipeux brun	- 97 -
V. Programmation de l'axe hypothalamo-adipocytaire durant la période périnatale	- 99 -
A. Les modifications de l'environnement nutritionnel périnatal	- 99 -
B. La restriction protéique	- 104 -
C. La composante génétique	- 107 -
D. L'exposition fœtale aux glucocorticoïdes	- 107 -
E. L'insuffisance placentaire : modèle de ligature de l'artère utérine	- 108 -
Objectifs.....	- 111 -
Articles.....	- 115 -
Discussion.....	- 153 -

I.	L'absence de « catch-up » : une protection contre le développement du syndrome métabolique ?	- 155 -
A.	Conservation de l'intégrité de l'hypothalamus.....	- 155 -
B.	La situation incertaine de la périphérie	- 159 -
II.	Les rats FR30 sont-ils résistants à la leptine ?	- 167 -
III.	Les glucocorticoïdes : cause ou conséquence de la programmation fœtale ?.....	- 171 -
IV.	La dénutrition maternelle induit-elle une perte du rythme circadien ?	- 175 -
A.	Régulation physiologique du rythme circadien	- 175 -
B.	Rythmes circadiens et métabolisme.....	- 177 -
C.	Les rats FR30 présentent-ils un décalage de leurs rythmes biologiques ?.....	- 179 -
	Conclusion générale	- 185 -
	Travaux annexes.....	- 189 -
	Références.....	- 203 -

11 β -HSD :	<i>11β-HydroxySteroid Dehydrogenase</i>
ACC :	<i>Acétyl-coA Carboxylase</i>
ACTH :	<i>Adrénocorticotrophine</i>
AG :	<i>Acides Gras</i>
AGRP :	<i>Agouti-Related Peptide</i>
AHA :	<i>American Heart Association</i>
AHL :	<i>Aire hypothalamique latérale</i>
AMPc :	<i>Adénosine Monophosphate cyclique</i>
C/EBPs :	<i>CCAAT/Enhancer Binding Proteins</i>
CART :	<i>Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript</i>
CCK :	<i>Cholécystokinine</i>
CRF :	<i>Corticotropin Releasing Factor</i>
CRH :	<i>Corticotropin Releasing Hormone</i>
DEX :	<i>Dexaméthasone</i>
DM :	<i>Dénutrition Maternelle</i>
FAS :	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FID :	<i>Fédération Internationale des Diabétiques</i>
FSV :	<i>Fraction Stroma-Vasculaire</i>
GH :	<i>Growth Hormone</i>
GHSR1a :	<i>GH Sécrétagogue Receptor 1a</i>
GLP1 :	<i>Glucagon-Like Peptide 1</i>
GLP2 :	<i>Glucagon-Like Peptide 2</i>
HF :	<i>High-Fat</i>
ICV :	<i>Intra-Cérébroventriculaire</i>
IMC :	<i>Indice de Masse Corporelle</i>
KO :	<i>Knock-Out</i>
LHS :	<i>Lipase Hormono-Sensible</i>
MCR-3 :	<i>Récepteur 3 à la Mélanocortine</i>
MCR-4 :	<i>Récepteur 4 à la Mélanocortine</i>
MCH :	<i>Melanin-Concentrating Hormone</i>
NA :	<i>Noyau Arqué</i>
NDM :	<i>Noyau Dorsomédian</i>
NECP :	<i>National Cholesterol Education Program</i>

NPV :	Noyau Paraventriculaire
NPY :	Neuropeptide Y
NT :	Neurotensine
NTS :	Noyau du Tractus Solitaire
NVM :	Noyau Ventromédian
OIA :	Obésité induite par l'alimentation
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PC :	<i>Prohormone Convertase</i>
POMC :	<i>Pro-OpioMélandoCortine</i>
PPAR γ :	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ</i>
Pref-1 :	<i>Preadipocyte Factor 1</i>
PYY :	Peptide YY
RCIU :	Retard de Croissance Intra-Utérin
RPM :	Restriction protéique maternelle
SM :	Syndrome Métabolique
SREBP :	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>
T :	Témoin
TA :	Tissu Adipeux
TAB :	Tissu Adipeux brun
TC :	Tronc Cérébral
TG :	Triglycéride
TNF α :	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TRH :	<i>Thyrotropin Releasing Hormone</i>
UCP1 :	<i>Uncoupling Protein 1</i>
α -MSH :	<i>α-Melanocyte-Stimulating Hormone</i>

Tableau 1 : Définition du SM en fonction des différentes organisations

Tableau 2 : Mesures délimitant l'obésité abdominale en fonction des ethnies

Tableau 3 : Prévalence de l'obésité en fonction du sexe et du pays d'origine chez des individus âgés de 15 ans et plus

Tableau 4 : Prévalence du SM en fonction du sexe et du pays d'origine chez des individus âgés de 20 ans et plus, selon la définition du NCEP

Tableau 5 : Origines potentielles du RCIU

Tableau 6 : Association entre stress fœtal et pathologies chez l'adulte

Tableau 7 : Association entre fenêtre de développement et mécanismes de programmation fœtale impliqués

- Figure 1 :** Prévalence du SM chez les américains en fonction des symptômes et du sexe
- Figure 2 :** Prévalence du SM en fonction du sexe et de l'âge
- Figure 3 :** Courbes de croissance du fœtus et du nouveau-né : illustration du retard de croissance intra-utérin
- Figure 4 :** Pourcentage de nouveau-nés pesant moins de 2,500 kg à la naissance
- Figure 5 :** Illustration de la théorie de programmation fœtale de Barker
- Figure 6 :** Schéma du fonctionnement de l'axe somatotrope
- Figure 7 :** Schéma du fonctionnement de l'axe corticotrope
- Figure 8 :** Représentation schématique des principaux mécanismes de la régulation épigénétique
- Figure 9 :** Illustration des effets de la supplémentation en acide folique sur la répartition du pelage de la descendance
- Figure 10 :** Illustration de l'impact des contraintes extérieures sur la physiologie de l'individu
- Figure 11 :** Illustration des différents états possibles de la balance énergétique
- Figure 12 :** Représentation schématique simplifiée de la boucle de régulation de la prise alimentaire
- Figure 13 :** Disposition des principaux noyaux impliqués dans la prise alimentaire chez le rat
- Figure 14 :** Schéma des projections centrales des populations orexigéniques et anorexigéniques de l'hypothalamus
- Figure 15 :** Schéma de la régulation de la prise alimentaire au niveau du noyau arqué
- Figure 16 :** Schéma de la voie de signalisation intracellulaire de la leptine
- Figure 17 :** Schéma du mode d'action de la leptine
- Figure 18 :** Représentation schématique de la régulation périphérique de la prise alimentaire
- Figure 19 :** Représentation schématique d'un adipocyte blanc
- Figure 20 :** Représentation schématique de la répartition des différents dépôts adipeux de l'organisme
- Figure 21 :** Représentation de la composition du tissu adipeux
- Figure 22 :** Schéma de la diversité cellulaire du tissu adipeux
- Figure 23 :** Représentation schématique d'un adipocyte brun

Figure 24 : Schéma de la boucle de régulation du rythme circadien dans le noyau suprachiasmatique

Figure 25 : Variation de l'expression de gènes d'horloge sur 24 heures dans le tissu adipeux périrénal

Figure 26 : Variation de l'expression de gènes d'horloge sur 24 heures dans le foie

Introduction

I. Hypothèse de l'origine fœtale de pathologies chroniques chez l'adulte

A. Évidences épidémiologiques

L'hypothèse de l'origine fœtale de pathologies chroniques chez l'adulte repose sur le fait que les facteurs environnementaux et tout particulièrement la nutrition, agissent très précocement lors du développement fœtal et programment les risques de développer des pathologies métaboliques ou cardiovasculaires chez l'adulte. Avant qu'elle ne soit clairement énoncée, de nombreux liens ont été proposés entre des événements survenus précocement dans la vie fœtale et l'apparition de pathologies cardiovasculaires chez l'adulte. En 1977, Forsdahl émet le postulat selon lequel la pauvreté *via* le déficit nutritionnel qu'elle entraîne, résulterait en une vulnérabilité aux accidents cardiovasculaires chez l'adulte soumis à un environnement nutritif plus riche (Forsdahl, 1977). En 1985, Wadsworth observe sur une population d'hommes et de femmes nés en 1946 au Royaume-Uni que la pression artérielle chez l'adulte est inversement proportionnelle à son poids de naissance (Wadsworth *et al.*, 1985). Peu après, Barker et ses collaborateurs émettent l'hypothèse selon laquelle un environnement délétère perturbant la croissance et le développement du fœtus, augmenterait les risques de pathologies ischémiques cardiaques (Barker *et al.*, 1989). De nombreuses études renforcent cette hypothèse en montrant un lien entre petit poids de naissance et petit poids à 1 an, et les plus hauts taux de mortalité due à un épisode cardiovasculaire. Une série d'études épidémiologiques à l'échelle mondiale a confirmé cette première observation. Ces études ont en effet, pu établir un lien entre une perturbation de la croissance fœtale précoce et l'augmentation de la vulnérabilité à l'hypertension, l'intolérance au glucose, au diabète de type 2 non-insulino-dépendant, à la résistance à l'insuline et l'obésité chez l'adulte. L'ensemble de ces pathologies sont autant de symptômes majeurs du syndrome métabolique (SM), encore appelé syndrome X. L'hypothèse de l'origine fœtale ou développementale de pathologies chroniques chez l'adulte tend à expliquer l'apparition du SM, ou de pathologies qui lui sont associées chez l'adulte.

Tableau 1 : Définition du SM en fonction des différentes organisations

OMS (1999)		EGIR (1999)		NCEP ATP III (2001)		FID (2006)	
Symptômes obligatoires							
Intolérance au glucose ou insulino-résistance ou diabète de type 2 + 2 des altérations suivantes		Hyperinsulinémie (non diabétique) + 2 des altérations suivantes		3 des altérations suivantes		Obésité abdominale + 2 des altérations suivantes	
Obésité : tour de taille en cm							
IMC $\geq 30\text{kg.m}^{-2}$		Homme	Femme	Homme	Femme	Dépend de l'ethnie	
		94	80	102	88		
Hypertension							
$\geq 140/90$ mmHg		$\geq 140/90$ mmHg		$\geq 130/85$ mmHg		$\geq 130/85$ mmHg	
Dyslipidémie : concentration d'HDL cholestérol et de Triglycérides en mmolL⁻¹							
Homme	Femme	HDL < 1 TG > 2		Homme	Femme	Homme	Femme
HDL < 0,9 TG > 1,7	HDL < 1 TG > 1,7			HDL < 1,3 TG > 1,7	HDL < 1,29 TG > 1,7	HDL < 1,03 TG > 1,7	HDL < 1,29 TG > 1,7
Autres							
		Hyperglycémie à jeun ≥ 110 mg.dL ⁻¹		Hyperglycémie à jeun ≥ 110 mg.dL ⁻¹		Hyperglycémie à jeun ≥ 110 mg.dL ⁻¹ ou Diabète de type 2	

OMS : Organisation Mondiale de la Santé ; EGIR : *European Group for the Study of Insulin Resistance* ; NCEP ATP III : *National Cholesterol Education Program: Third Adult Treatment Panel* ; FID : Fédération Internationale du Diabète ; HDL : *High Density Lipoprotein* ; TG : Triglycérides

Tableau 2 : Mesures délimitant l'obésité abdominale en fonction de l'origine géographique

Groupe ethnique	Tour de taille	
	Homme	Femme
Europe	≥ 94 cm	≥ 80 cm
États Unis	≥ 102 cm	≥ 88 cm
Asie	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Japon	≥ 85 cm	≥ 90 cm
Chine	≥ 85 cm	≥ 80 cm
Amérique du Sud et centrale	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Afrique subsaharienne et orientale	≥ 94 cm	≥ 80 cm

B. Le syndrome métabolique

1. Définition du syndrome métabolique

La première description du SM a été émise par Reaven en 1988, afin de décrire le regroupement de différentes anomalies métaboliques : l'hyperinsulinisme, l'intolérance au glucose, l'hypertriglycéridémie et les pathologies cardiovasculaires chez un même individu (Reaven, 1988). Un an plus tard, Kaplan renomme ce concept « *The Deadly Quartet* ». Il le définit par la combinaison de l'obésité abdominale, la diminution de tolérance au glucose, l'hypertriglycéridémie et l'hypertension artérielle (Kaplan, 1989). En 1992, ce syndrome est corrélé à une hyperinsulinémie, prémice de l'insulinorésistance qui précède l'apparition des troubles métaboliques (Haffner *et al.*, 1992).

De nombreuses définitions du SM ont vu le jour suite à ces observations scientifiques. Bien qu'elles présentent des différences, les principales altérations dues au SM restent constantes : l'obésité, l'insulinorésistance, la dyslipidémie et l'hypertension (Tableau 1). Une harmonisation internationale des symptômes du SM est donc nécessaire. La Fédération Internationale des Diabétiques (FID) et l'*American Heart Association* (AHA) proposent alors une définition internationale. Dans la mesure où la prévalence de l'insulinorésistance associée à l'obésité et celle des risques cardiovasculaires sont en constante augmentation (Fontbonne *et al.*, 1992), la FID attribue une place d'importance à ces phénomènes. L'obésité est en effet, devenue un critère obligatoire dans la définition du SM. De plus, la définition de l'obésité abdominale prend maintenant en compte l'origine géographique du patient (Tableau 2). Le tour de taille mesuré correspondant à un Indice de Masse Corporelle (IMC) ≥ 25 (Lean *et al.*, 1995) (IMC : rapport poids de l'individu / sa masse au carré). La présence de trois des cinq critères suivant est nécessaire au diagnostic du SM :

- tour de taille élevée en fonction des ethnies et du sexe
- TG élevés $> 1,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ ou traitement pour réduire les TG
- HDL-C réduit $< 1 \text{ mmol.L}^{-1}$ chez l'homme et $< 1,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ chez la femme ou traitement pour réduire les HDL-C
- tension élevée $\geq 130/85 \text{ mmHg}$ ou traitement de l'hypertension

Tableau 3 : Prévalence de l'obésité en fonction du sexe et du pays d'origine chez des individus âgés de 15 ans et plus. Rapport de L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2010

Pays	Prévalence de l'Obésité (IMC $\geq 30\text{kg.m}^{-2}$) en %	
	Homme	Femme
	Amérique	
États Unis	44,2	48,3
Mexique	30,1	41
	Asie	
Chine	4,1	3,6
Inde	1,7	2
Japon	2,3	1,1
Tonga	64	78,1
	Europe	
Allemagne	22,9	22,1
Espagne	17,3	17,3
France	9	7,6
	Océanie	
Australie	28,4	29,1

Tableau 4 : Prévalence du SM en fonction du sexe et du pays d'origine chez des individus âgés de 20 ans et plus, selon la définition du NCEP

Pays	Prévalence du syndrome métabolique en %	
	Homme	Femme
	Amérique	
États Unis	24	23,4
Mexique	26,6	
	Asie	
Chine	5,8	
Inde	22,9	39,9
Japon	19	7
	Europe	
Allemagne	23,5	17,6
Espagne	22,3	30,7
France	23	16,9
	Océanie	
Australie	24,4	19,9

- taux de glucose à jeun élevé $\geq 100 \text{ mg.dL}^{-1}$ ou traitement du diabète. Le seuil de la glycémie à jeun correspond maintenant à la définition plus récente de l'intolérance au glucose (Genuth *et al.*, 2003).

Les mesures limites du tour de taille proposées sont à mettre en relation avec l'apparition de pathologies cardiovasculaires liées au surpoids. Cependant, le risque de développer ce type de pathologies par rapport au tour de taille n'est pas encore clairement défini.

Bien que la définition du FID prenne en compte les récentes avancées scientifiques, c'est celle du NCEP ATP III qui est utilisée dans les études épidémiologiques.

2. Prévalence du syndrome métabolique

Le SM est en constante augmentation notamment chez les populations subissant une « mutation » culturelle avec l'adoption de styles de vie occidentaux. En 2000, 2,8 % de la population mondiale était atteinte de diabète de type 2 soit 171 millions de personnes dans le monde (Wild *et al.*, 2004). Les scientifiques prévoient alors une forte augmentation de sa prévalence avec 366 millions de personnes touchées à travers le monde d'ici 2030. Ces chiffres doivent cependant, être revus à la hausse suite à une étude récente qui a évalué à 347 millions le nombre de personnes atteintes de diabète de type 2 en 2008 (Danaei *et al.*, 2011). Cette augmentation est à corréliser avec l'augmentation de la prévalence de pathologies métaboliques chroniques associées au SM telles que l'obésité.

L'obésité se définit par un IMC $\geq 30 \text{ kg.m}^{-2}$. Lorsque l'IMC est supérieur à 40 kg.m^{-2} , on parle d'obésité morbide. La prévalence de l'obésité ne cesse d'augmenter, et plus alarmant, touche des individus de plus en plus jeunes. Les chiffres récemment énoncés par l'OMS font basculer l'obésité d'un état d'épidémie à celui de pandémie (Tableau 3).

Actuellement, un adulte sur cinq souffrirait d'un ou plusieurs symptômes du SM. Le SM touche plus particulièrement les adultes, mais en Occident, il est de plus en plus observé chez les jeunes adultes, voire chez les enfants. Selon certains experts, le SM dépasserait bientôt le tabagisme comme première cause de pathologie cardiovasculaire dans le monde (Tableau 4). En Europe, sa prévalence est estimée à 20 % chez les adultes. En France, le

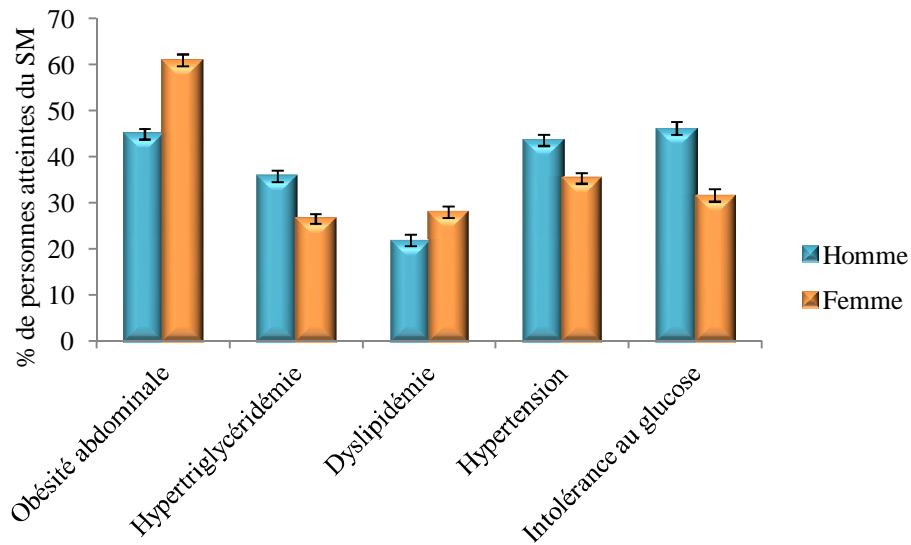


Figure 1 : Prévalence du SM chez les américains en fonction des symptômes et du sexe, selon la définition du NCEP ATP III. D’après Ervin (2009)

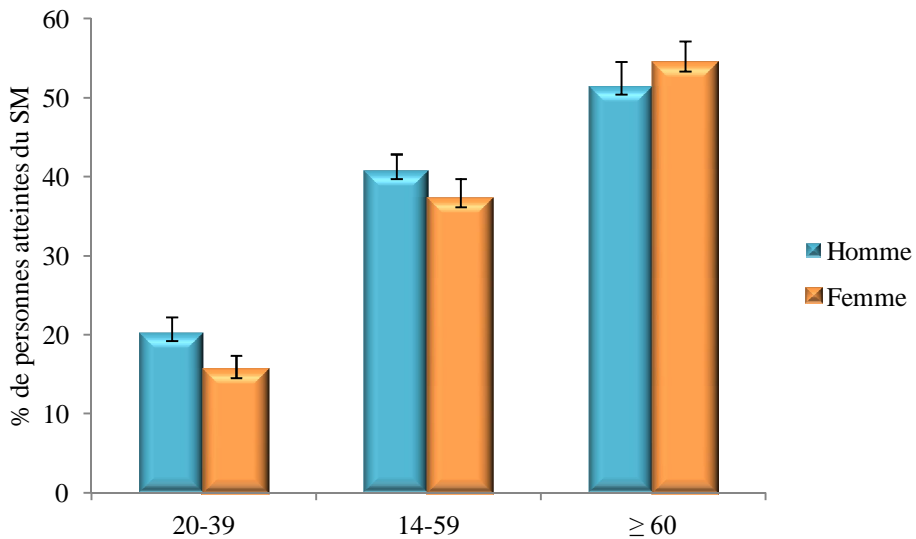


Figure 2 : Prévalence du SM chez les américains en fonction du sexe et de l’âge, selon la définition du NCEP ATP III. D’après Ervin (2009)

syndrome métabolique serait la première cause de mortalité avec plus de 180 000 décès par an (Rapport du Haut comité de santé publique, juin 2000 : « Pour une politique de nutrition de santé publique en France » Rapport de l’OMS, 1998, 1999 et 2000), devenant ainsi un problème majeur de santé publique. Le taux de mortalité du SM est souvent lié aux complications d’un diabète de type 2 ou de pathologies cardiovasculaires.

Les hommes comme les femmes peuvent développer un SM. Cependant, la prévalence des symptômes du SM diffèrent clairement selon le sexe (Figure 1) (Ervin, 2009). Les experts ont donc conclu que la définition nécessitait des critères de mesures différents en fonction du sexe, notamment concernant l’obésité abdominale (Tableaux 1 et 2). Bien qu’il existe un dimorphisme sexuel de la prévalence de cette pathologie en fonction des symptômes présents chez le patient, hommes et femmes semblent avoir les mêmes risques de développer le SM (Figure 2). L’âge semble être un facteur de risque aggravant l’apparition du SM (Figure 2) et devrait également être pris en compte.

Les critères d’évaluation du SM devraient donc être établis par rapport à un écart à la norme en fonction de l’âge, du sexe et de l’ethnie du patient.

On observe également une grande disparité de la prévalence du SM en fonction du pays étudié. Bien que l’apparition du mode de vie occidentale puisse expliquer certains chiffres, la répartition inégale du SM au sein d’une même population suggère que les Hommes sont victimes d’une prédisposition différentielle à cette pathologie. Il existerait donc des facteurs génétiques et/ou environnementaux qui « programmeraient » l’apparition du SM.

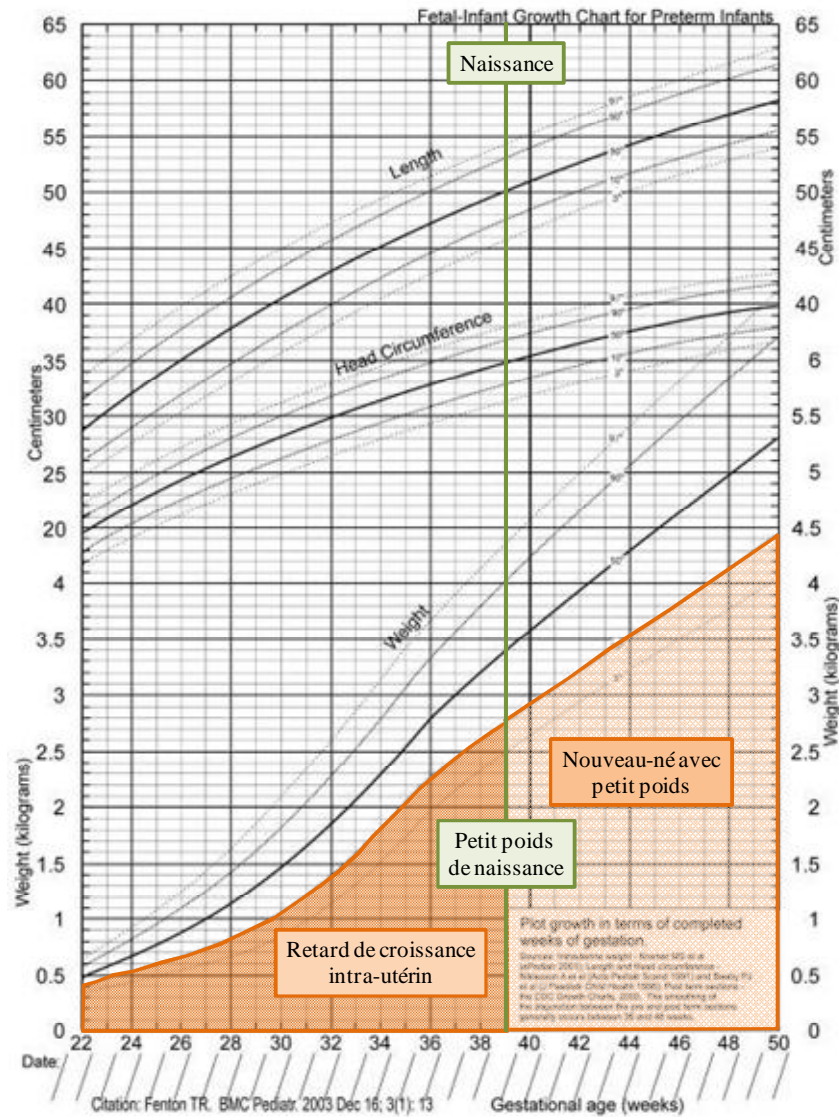


Figure 3 : Courbes de croissance du fœtus et du nouveau-né : illustration du retard de croissance intra-utérin. Selon (Fenton, 2003)

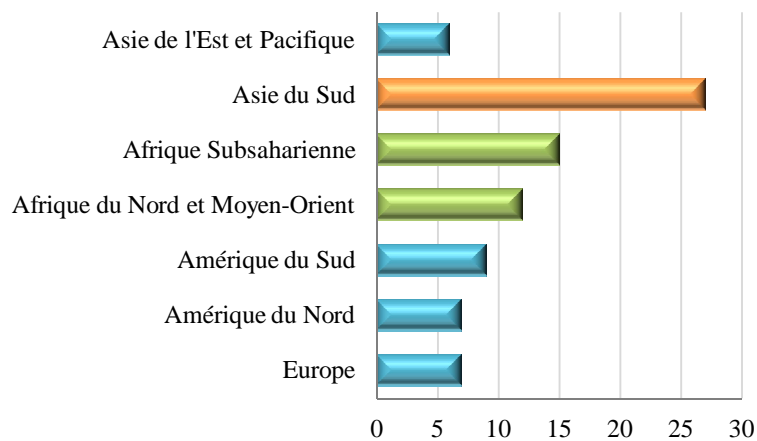


Figure 4 : Pourcentage de nouveau-nés pesant moins de 2,500 kg à la naissance. Rapport de l'UNICEF 2007

II. Notion de programmation foetale

A. Le retard de croissance intra-utérin

Le poids de naissance semble intimement lié au devenir physiologique de l'adulte. Comme nous venons de le voir, de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence l'existence d'une relation entre le petit poids de naissance pour une durée de gestation normale et le développement, plus tard au cours de la vie adulte, de pathologies cardiovasculaires et métaboliques.

On qualifie de faible le poids de naissance lorsque celui-ci est inférieur ou égal à 2,5 kg. Cette expression regroupe les naissances prématurées, soit né avant la 37^{ème} semaine d'aménorrhée, et les naissances à terme. Ce petit poids de naissance pour une durée normale de gestation, entre 37 et 41 semaines chez l'Homme, résulte généralement d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Rosenberg, 2008). C'est une notion dynamique qui traduit une altération de la croissance du fœtus. Il est défini sur le plan épidémiologique comme un poids de naissance inférieur au 10^{ème} percentile pour le sexe et l'âge gestationnel (Figure 3). Ce seuil permet de dépister les nouveau-nés exposés à une morbidité et une mortalité accrues. Le RCIU est en effet, l'une des cinq principales causes de mortinaissance à ce jour. Il représente environ 15 % des naissances à terme et est particulièrement présent dans les pays en voie de développement (Figure 4).

On distingue deux types de RCIU :

- l'harmonieux (30 %) qui se caractérise par une atteinte proportionnelle du poids, de la taille et du périmètre crânien. Il reflète une installation précoce de l'altération de la croissance foetale.
- le disharmonieux (70 %) qui affecte préférentiellement la croissance pondérale avec conservation de la croissance staturale et du périmètre crânien. La réduction de la croissance interviendrait plus tardivement dans ce cas, principalement au cours du dernier trimestre.

Tableau 5 : Origines potentielles du RCIU. D'après Hendrix and Berghella (2008)

Origine	Causes
Maternelle	<ul style="list-style-type: none"> • Syndrome vasculo-rénal (35 % des cas) : l'hypertension artérielle gravidique est la première cause de RCIU • Tabagisme (5 %) et autres intoxications tels que l'alcool ou la cocaïne • Pathologies maternelles chroniques (4 %) du type cardiopathies • Maladies auto-immunes • Malnutrition ou dénutrition maternelle • Causes mécaniques : malformation utérine, fibrome utérin, grossesse multiple • Facteurs maternels : primiparité, petite taille maternelle (< 150 cm), l'âge, l'ethnie, lieu et conditions de vie • Antécédents familiaux de RCIU
Placentaire	<ul style="list-style-type: none"> • Malformations telles que l'artère ombilicale unique ou l'infarctus placentaire • Insuffisance placentaire pouvant entraîner une pré-éclampsie • Altération de l'apport en nutriments vers le fœtus
Fœtale	<ul style="list-style-type: none"> • Infection (5 à 10 % des cas) telles que la toxoplasmose, la malaria ou la rubéole • Malformations (10 % des cas) s'associant ou non à des anomalies chromosomiques

Ces deux formes diffèrent donc par la période à laquelle s'est installée la perturbation de la croissance fœtale. Cette définition ne permet cependant pas de différencier les décours de croissance. Certains nouveau-nés peuvent avoir achevé leur croissance mais se trouver en fin de distribution pondérale. Il est également possible que la croissance fœtale soit ralentie suite à une dénutrition maternelle mais que le nouveau-né ait un poids cliniquement qualifié de normal selon les courbes précédemment évoquées. Il n'y a en effet, aucune mesure clinique permettant de faire la distinction entre les nouveau-nés de même poids de naissance ayant eu des évolutions de croissance différentes.

L'origine du RCIU peut être très variable (Hendrix and Berghella, 2008). Elle peut concerner directement le fœtus ou son environnement proche : la mère et/ou le placenta. On peut ainsi les regrouper en trois catégories (Tableau 5). Cependant, 30 % des RCIU restent inexpliqués. Il est possible que leur origine soit génétique.

Tableau 6 : Association entre stress fœtal et pathologies chez l'adulte

Facteurs environnementaux responsables de la programmation fœtale	Pathologies associées
Restriction alimentaire maternelle : <ul style="list-style-type: none"> • Restriction calorique • Restriction protéique • Restriction en micronutriments 	Pathologies cardiovasculaires Diabète de type 2 Hypertension Dyslipidémie
Substances exogènes : <ul style="list-style-type: none"> • Glucocorticoïdes • Nicotine 	Obésité Ostéoporose Schizophrénie
Perturbations de la circulation utéro-placentaire	
Hypoxie périnatale Pré-éclampsie	Hypertension artérielle pulmonaire
Comportement maternel protecteur	Résistance au stress

B. Concept de programmation fœtale

1. La théorie de Barker

Bien qu'il existe des gènes associés à l'obésité ou impliqués dans l'homéostasie énergétique, la composante génétique seule ne peut expliquer l'augmentation dramatique de la prévalence du surpoids ces dernières années. Ceci suggère l'éventuelle implication de l'environnement. En effet, la grande majorité des cas est plutôt liée à un style de vie sédentaire et à une mauvaise alimentation.

Afin de tenter d'expliquer le lien entre petit poids de naissance et apparition de pathologies métaboliques chez l'adulte, Hales et Barker proposent, en 1992, l'hypothèse du « *thrifty phenotype* » ou phénotype d'épargne ou économe (Hales and Barker, 1992), dérivée de l'hypothèse de « *thrifty genotype* ». Selon cette hypothèse, des gènes « d'épargne » auraient été sélectionnés au cours de l'évolution, quand les ressources nutritives étaient limitées. Ce génotype permettrait ainsi une production massive et rapide d'insuline, mais faciliterait également le stockage des lipides, favorisant l'apparition d'une résistance à l'insuline, voire d'un diabète de type 2 (Neel, 1962). L'hypothèse de « *thrifty phenotype* » quant à elle repose sur l'idée selon laquelle le développement fœtal serait étroitement lié à l'environnement nutritionnel. Un environnement intra-utérin délétère, à l'origine d'un petit poids de naissance caractéristique d'un RCIU, entraînerait une programmation métabolique et tissulaire du fœtus. Il est désormais clairement établi que l'origine du stress prénatal conditionne la nature de la pathologie chez l'adulte (Tableau 6). Ainsi dans un environnement par exemple pauvre en nutriments, des réponses adaptatives seraient mises en place pour favoriser la croissance d'organes clés de l'organisme tel que le cerveau, au détriment d'autres organes périphériques. Il en résulterait une altération du métabolisme postnatal permettant la survie du nouveau-né dans des conditions d'apport pauvre en nutriments. Cette adaptation se révèle cependant néfaste lorsque l'environnement nutritionnel postnatal est adéquat ou surabondant par rapport à l'environnement prénatal. La réponse physiologique mise en place, pourrait en effet, entraîner l'apparition de troubles du métabolisme énergétique. Ce concept, selon lequel il existerait des réponses adaptatives à un environnement intra-utérin délétère durant la vie embryonnaire, est appelé programmation fœtale (Lucas, 1991). À long terme,

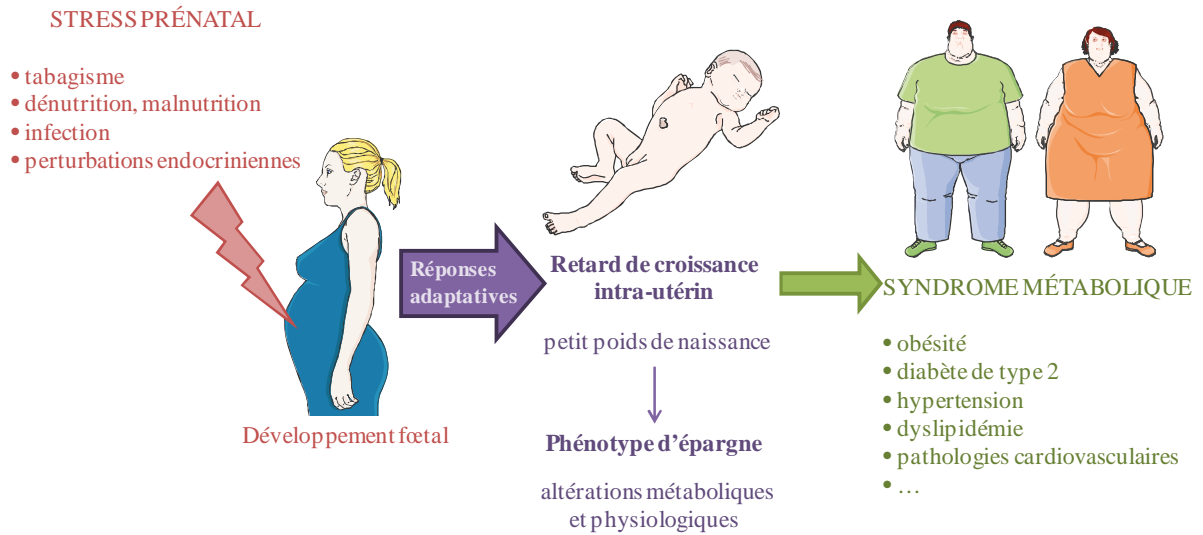


Figure 5 : Illustration de la théorie de programmation fœtale de Barker. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

cette programmation augmenterait la vulnérabilité aux pathologies métaboliques du SM à l'âge adulte (Barker, 2004) (Figure 5). L'un des points cruciaux de cette définition est la notion d'existence de périodes clés de la gestation durant lesquelles des perturbations spécifiques en nutriments entraîneraient des modifications du développement embryonnaire ayant des conséquences défavorables chez l'adulte (Thoman and Levine, 1970). Des travaux ont ainsi pu montrer qu'une dénutrition maternelle précoce affecte de manière permanente la croissance du rat, tandis qu'une dénutrition plus tardive n'aura que des effets transitoires (McCance and Widdowson, 1974). Il existerait donc des fenêtres critiques de l'ontogenèse embryonnaire durant lesquelles une exposition à un environnement délétère entraînerait des altérations physiologiques. Le terme « d'empreinte métabolique » est également utilisé pour décrire l'ensemble de ces phénomènes physiologiques impliqués dans le lien entre environnement nutritionnel intra-utérin et les conséquences sur la santé de la descendance (Waterland and Garza, 1999).

Tableau 7 : Association entre fenêtre de développement et mécanismes de programmation fœtale impliqués. D'après McMillen et Robinson (2005)

Fenêtre critique de développement	Mécanismes de programmation fœtale
<ul style="list-style-type: none">• Cellules germinales primordiales ou matures• Ovulation• Fécondation : zygote• Blastomère	Régulation épigénétique de l'expression génique
<ul style="list-style-type: none">• Différenciation• Organogenèse	Régulation du cycle cellulaire : prolifération et apoptose
<ul style="list-style-type: none">• Croissance fœtale• Croissance postnatale	Réponses adaptatives : programmation cardiovasculaire, métabolique et neuroendocrinienne

2. Les mécanismes de la programmation foetale

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la programmation sont encore mal connus. Des processus physiologiques liés à l'environnement et génétiques semblent être impliqués et l'aspect psychologique est de plus en plus évoqué. Les modèles animaux ont mis en évidence des mécanismes potentiels de la programmation foetale (Waterland and Garza, 1999). Il semblerait que la nature de ces mécanismes soit dépendante de la fenêtre de développement à laquelle interviennent les modifications de l'environnement (Tableau 7).

a. La programmation endocrinienne

Les modèles animaux

De nombreux modèles animaux de RCIU ont vu le jour notamment chez le rat, afin de permettre une meilleure compréhension des mécanismes endocriniens intervenant dans la mise en place du SM et plus particulièrement des effets à long terme de la dénutrition intra-utérine. Les plus répandus sont les restrictions alimentaires par diminution de l'apport calorique quotidien ou restriction en macronutriments tels que les protéines, certaines vitamines ou les lipides.

- Les modèles de sous-nutrition maternelle :
 - la restriction calorique

De nombreux modèles de programmation foetale utilisent la restriction alimentaire globale. Ces modèles entraînent des perturbations endocrines et métaboliques chez la descendance adulte. Une réduction de 50 % de l'apport alimentaire quotidien durant la dernière semaine de gestation chez le rat entraîne un petit poids de naissance et diminue la masse de cellules β -pancréatiques (Garofano *et al.*, 1997 ; Bertin *et al.*, 2002). Lorsque cette dénutrition est étendue à la période de lactation, la réduction de la masse des cellules β -pancréatiques est permanente, et une intolérance au glucose s'installe progressivement en fonction de l'âge de la descendance (Garofano *et al.*, 1999). Ce modèle apporte donc la preuve de l'existence de périodes critiques du développement influençant spécifiquement le devenir de l'organisme. Il existe des modèles de restriction plus sévère où les rattes gestantes

reçoivent uniquement 30 % de la ration alimentaire quotidienne tout au long de la gestation. À la naissance, les ratons sont élevés et nourris par des femelles non dénutries. Il en résulte un RCIU marqué, et la descendance présente une hyperphagie à l'âge adulte, ainsi qu'une hyperinsulinémie, de l'hypertension et une hyperleptinémie associée à un phénotype d'obésité (Vickers *et al.*, 2000). Des études ont également montré que la dénutrition maternelle précoce programme le tissu adipeux ainsi que son métabolisme chez la descendance. Ces altérations seraient à l'origine du phénotype d'obésité chez l'adulte, tout particulièrement lorsque la descendance est soumise à un régime hypercalorique dès le sevrage (Bispham *et al.*, 2005).

- la restriction protéique

De nombreuses études ont montré que les acides aminés sont des éléments clés de la croissance foetale : ils sont à la base des protéines, des précurseurs d'hormones et d'autres molécules. Cependant, à forte dose, ils peuvent être impliqués dans le stress oxydatif et être néfastes. Les protéines auraient donc un rôle supposé dans le « *thrifty phenotype* » (Hales and Barker, 1992), il n'est donc pas étonnant de constater que le modèle de restriction protéique est l'un des plus répandus. Dans un modèle de restriction protéique, les femelles voient leur portion quotidienne de protéines réduite de 20 % à 5-8 % mais de même apport calorique qu'un régime standard (Snoeck *et al.*, 1990 ; Dahri *et al.*, 1991). Elles donnent naissance à des ratons de faible poids ayant subi un RCIU. Bien que ces mères retrouvent un régime normal dès la parturition, les petits conservent une déficience pondérale (Desai *et al.*, 1996). On constate également une diminution de la taille des adipocytes (Shepherd *et al.*, 1997).

- la taille de la portée

La taille de la portée est également un facteur modulé dans l'étude de l'impact de la nutrition postnatale précoce. Dans ce type de modèle, les nouveau-nés sont redistribués à la naissance en petite ou grande portée, ce qui reflète respectivement une sur- ou une sous-nutrition durant la période de lactation (Plagemann *et al.*, 1992). À l'âge adulte, les animaux issus des petites portées présentent une masse pondérale et une adiposité plus importantes que celles des animaux issus des grandes portées (Aubert *et al.*, 1980). Il a également été démontré que des ratons dénutris pendant la lactation ont une croissance

diminuée alors qu'une dénutrition après le sevrage ralentit la croissance sans l'altérer (Widdowson and McCance, 1963).

- l'insuffisance en fer

L'anémie est à l'origine des problèmes de vascularisation du placenta et de régulation d'hormones maternelles et fœtales pouvant entraîner une pré-éclampsie. Dans un modèle de déplétion maternelle en fer, les nouveau-nés présentent un petit poids de naissance et une augmentation de la pression artérielle (Gambling *et al.*, 2003) due en partie à une diminution du nombre de néphrons (Lisle *et al.*, 2003).

- Les modèles de surnutrition maternelle :

- le régime riche en graisses

Bien que les modèles de dénutrition maternelle soient prépondérants, des modèles étudiant les effets d'une surnutrition maternelle sont de plus en plus décrits dans la littérature. En effet, le métabolisme intra-utérin peut également être perturbé par une surnutrition périnatale. Lorsque que les rattes gestantes sont soumises à un régime riche en graisses, la descendance présente des altérations du métabolisme lipidique, glucidique ainsi qu'une hypertension à l'âge adulte (Srinivasan *et al.*, 2006). L'application d'un régime riche en graisse durant la gestation et la lactation suffit à la programmation de certains traits du SM chez l'adulte (Buckley *et al.*, 2005 ; Khan *et al.*, 2005).

- l'obésité maternelle

Face à l'augmentation mondiale de la prévalence de l'obésité, les modèles de rattes gestantes obèses sont mis en place, afin de mieux comprendre l'apparition et la transmission de certains traits du SM à la descendance. Les animaux nés de mères obèses ont un tissu adipeux plus développé, un comportement hyperphagique, une résistance à l'insuline (Samuelsson *et al.*, 2008) ainsi qu'une hypertension (Nivoit *et al.*, 2009).

- Les modèles chirurgicaux :
 - La ligature de l'artère intra-utérine

Un milieu intra-utérin pauvre est non seulement dû à un apport nutritionnel maternel inadéquat, mais également à une fonction placentaire réduite. Chez l'Homme, l'insuffisance utéro-placentaire est une des principales causes de RCIU, car elle limite l'apport de substrats essentiels tels que les nutriments et l'oxygène au fœtus (Baschat and Hecher, 2004). Des ligatures uni- ou bilatérales de l'artère utérine chez le rat perturbent l'environnement fœtal et induisent un RCIU asymétrique (Wigglesworth, 1974). Ces modèles provoquent en particulier l'apparition d'un diabète de type 2 et d'une hypertension (Simmons *et al.*, 2001).

- Les modèles pharmacologiques :
 - le diabète durant la gestation

L'injection de streptozotocine mime l'apparition d'un diabète en détruisant sélectivement les cellules β -pancréatiques. L'induction d'un diabète durant la gestation induit une macrosomie associée à une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose (Kiss *et al.*, 2009). Ces observations montrent l'importance de la glycémie maternelle sur le développement du pancréas du fœtus.

- La surexposition aux glucocorticoïdes

L'administration de dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, provoque l'apparition d'un RCIU chez la plupart des espèces. Une surexposition aux glucocorticoïdes pourrait expliquer le lien entre RCIU et la programmation de l'apparition du SM à l'âge adulte. En effet, une exposition à la dexaméthasone, durant la troisième semaine de gestation chez le rat, augmente les risques de développer une intolérance au glucose, une insulino-résistance ainsi que de l'hypertension (Benediktsson *et al.*, 1993 ; Nyirenda *et al.*, 1998). D'autres études ont montré que le stress maternel induit par la dénutrition, augmente la concentration de glucocorticoïdes du fœtus. Ceci se traduit par un RCIU avec des effets à long terme sur le poids, le comportement alimentaire et le risque de développer un diabète de

type 2 (Lesage *et al.*, 2004). Les effets d'une restriction maternelle due à un régime inapproprié ou une fonction placentaire déficiente seraient médiés *via* une augmentation des glucocorticoïdes. En effet, la restriction protéique ou calorique entraînent une surexposition fœtale aux glucocorticoïdes (Langley-Evans *et al.*, 1996 ; Lesage *et al.*, 2001).

Les mécanismes potentiels de la programmation fœtale

La question se pose alors de savoir quels sont les tissus spécifiquement altérés par la programmation fœtale et comment sont-ils capables de mémoriser cette empreinte, malgré le phénomène continu de renouvellement cellulaire. De nombreux mécanismes semblent être impliqués dans la mise en place de cette programmation. Les phénomènes endocriniens les plus décrits sont :

- La diminution du nombre de cellules

Pendant le développement, les organes grandissent en augmentant leur nombre de cellules : hyperplasie, ou leur taille : hypertrophie. Un excès ou une pénurie de nutriments durant des périodes critiques de la croissance hyperplasique affectent le taux de divisions cellulaires, indépendamment des conditions nutritionnelles ultérieures (Winick and Noble, 1966). La dénutrition maternelle diminuerait donc la prolifération cellulaire, ce qui entraînerait des changements permanents dans le nombre de cellules (Waterland and Garza, 1999). Comme l'activité métabolique d'un organe est dépendante du nombre de cellules qui le compose, une diminution permanente de ce nombre pourrait affecter le métabolisme de l'organe. La réduction du nombre de cellules serait donc un mécanisme privilégié de la programmation fœtale. En effet, suite à une restriction protéique maternelle, la descendance présente une diminution de la prolifération et de la taille des îlots dans la tête du pancréas. Ces phénomènes sont également présents dans la queue du pancréas mais dans une moindre mesure (Snoeck *et al.*, 1990).

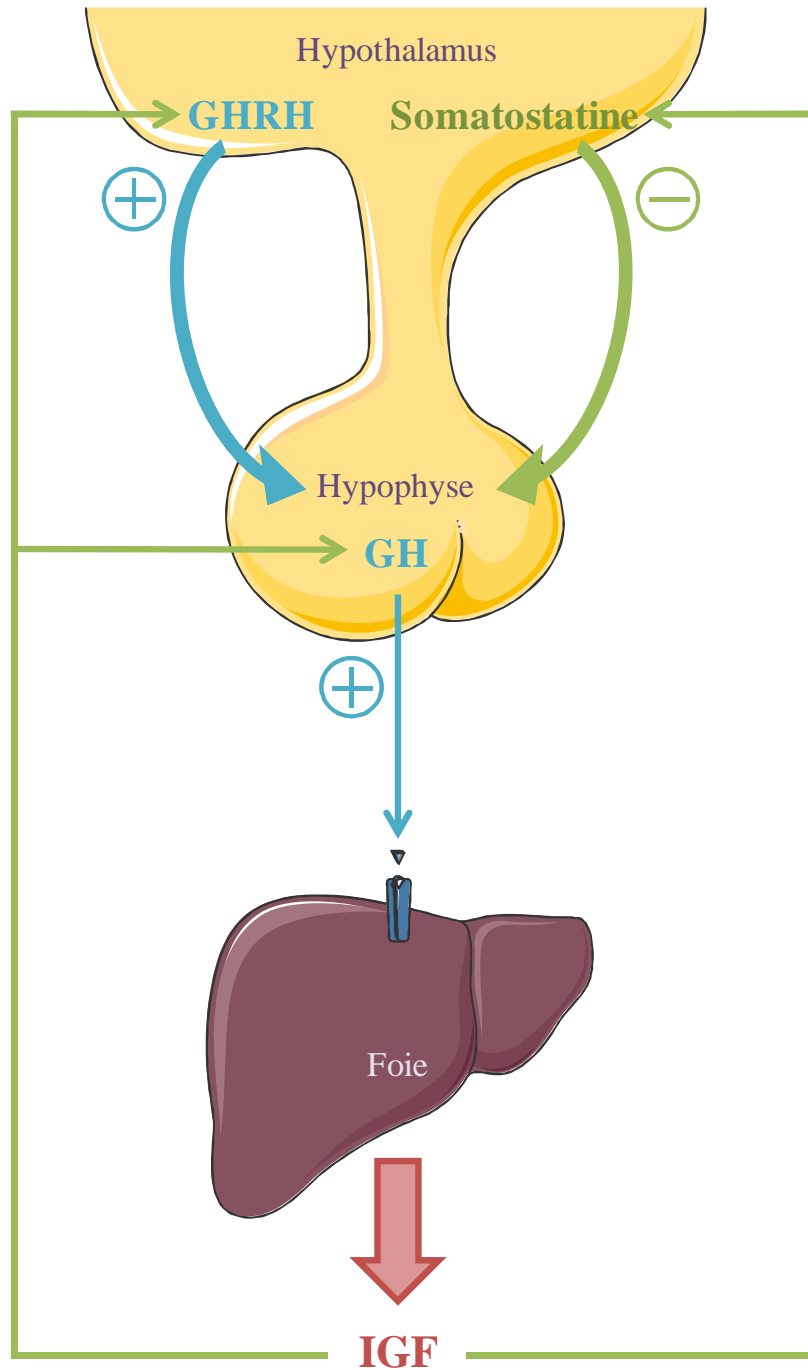


Figure 6 : Schéma du fonctionnement de l'axe somatotrope. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art. Flèche bleue : stimulation ; Flèche verte : inhibition ; GHRH : Growth Hormone Releasing Hormone ; GH : Growth Hormone ; IGF : insulin-like growth factors. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

Les organes seraient également profondément affectés par d'importantes altérations morphologiques pendant l'organogenèse, autre que des changements cellulaires. Les mécanismes potentiellement impliqués seraient des perturbations de la vascularisation, de l'innervation de l'organe, ou de la juxtaposition des différents types cellulaires le formant. En effet, lorsque la vascularisation de l'organe est affectée de manière permanente par la nutrition durant l'organogenèse, la réponse cellulaire aux nutriments ou hormones peut aussi être perturbée. Dans un organe comme le foie, la juxtaposition spécifique des cellules endothéliales et des cellules de Kupffer se fait pendant l'organogenèse et influence durablement le métabolisme hépatique. Pendant une période déterminée de l'organogenèse, le devenir de ces cellules est intimement lié à la concentration locale en nutriments. Un apport nutritionnel anormal pourrait donc engendrer une malformation de l'organe et son dysfonctionnement. D'autres études suggèrent que la présence anormale d'une hormone à une période critique du développement peut également affecter de manière permanente la réponse de cette hormone (Csaba, 1980).

Au niveau central, une importante dénutrition pendant le développement cérébral conduirait à une réduction permanente du nombre de cellules dans le cerveau (Winick and Noble, 1966). Il a également été suggéré qu'une perturbation de l'environnement nutritionnel pendant la mise en place des connexions neuronales aurait des conséquences métaboliques permanentes (Dorner, 1974).

- L'axe somatotrope

Le rôle de l'axe somatotrope varie selon les stades du développement : capital au cours de la croissance fœtale et postnatale, il est moins sollicité chez l'adulte (Fowden, 1995). L'hormone de croissance (GH) produite par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse, est contrôlée par l'équilibre entre deux hormones hypothalamiques : la *Growth Hormone Releasing Hormone* (GHRH) stimulatrice et la somatostatine inhibitrice (Figure 6). La GH est capitale à la croissance postnatale. En effet, des perturbations de son expression *in utero* ne semblent pas affecter la croissance (Fowden, 1995), mais il semblerait qu'elle influence le développement du tissu adipeux en diminuant la taille des adipocytes (Hausman *et al.*, 1993). La GH serait augmentée chez le fœtus suite à la dénutrition maternelle.

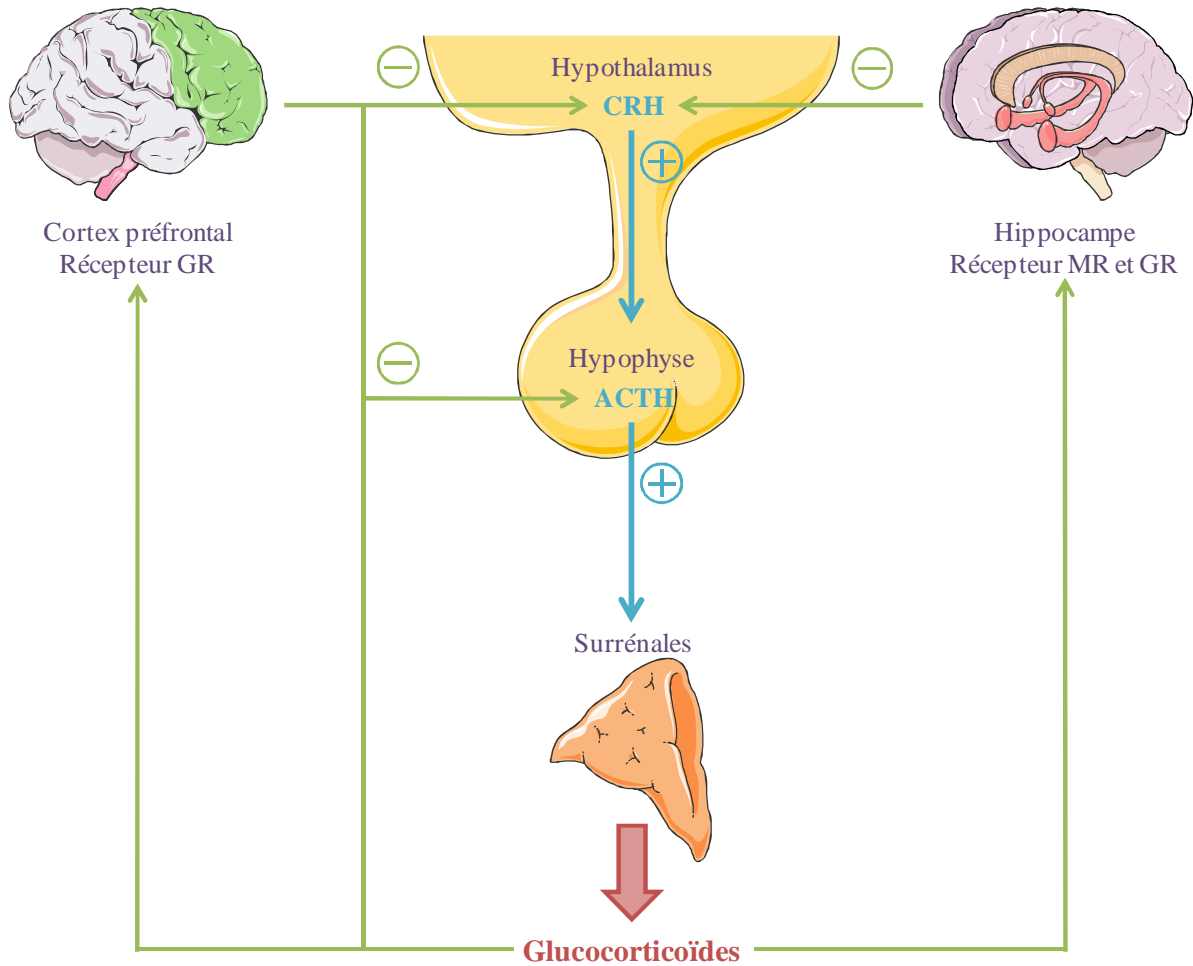


Figure 7 : Schéma du fonctionnement de l'axe corticotrope. Flèche bleue : stimulation ; Flèche verte : inhibition ; CRH : *corticotropin-releasing hormone* ; ACTH : *Adrenocorticotrophic hormone*. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

Les autres hormones impliquées dans la croissance fœtale sont des facteurs insulino-mimétiques : les insulin-like growth factors (IGF) I et II et l'insuline. Suite à la prise alimentaire et donc à la variation de la glycémie, l'insuline stimule la synthèse hépatique des IGF. Des études *in vitro* montrent également que les IGF peuvent bloquer l'apoptose. Cette action protectrice semble être importante lors du développement où une prolifération cellulaire rapide est nécessaire à la croissance des organes. La concentration d'IGFs varie en fonction de la qualité de la croissance fœtale (Verhaeghe *et al.*, 1993). Elles sont réduites en cas de RCIU (Leger *et al.*, 1996). De plus, l'inhibition de l'expression des gènes IGFs réduit la croissance fœtale et le poids de 40 % (Dechiara *et al.*, 1990 ; Baker *et al.*, 1993). La concentration en IGF-I étant dépendante du statut nutritionnel et tout particulièrement de la glycémie chez le fœtus, la dénutrition maternelle diminue la concentration sanguine en IGF-I chez le fœtus (Straus *et al.*, 1991). Cette diminution persiste après la naissance (Husted *et al.*, 2007) voire même à l'âge adulte lorsque la dénutrition a lieu tout au long de la gestation. L'action des IGFs est médiée par les récepteurs IGF de type 1 et 2 (IGF-1R et IGF-2R) et le récepteur à l'insuline. Chez la souris, l'inhibition de l'expression d'IGF-1R conduit à un retard de croissance plus sévère que suite à la délétion de l'expression des IGF, ce qui suggère que les IGFs agissent *via* IGF-2R pour stimuler la croissance tissulaire (Efstratiadis, 1998). Cependant, aucune étude ne montre de lien entre IGFs et RCIU chez l'homme.

Durant la vie fœtale, l'insuline stimule la production d'IGF. Sa concentration est positivement corrélée au poids de naissance. Des mutations du récepteur à l'insuline peuvent induire le syndrome de Lepréchaunisme associé à un RCIU marqué et une insulino-résistance.

- L'imprégnation des glucocorticoïdes

Au vu de la complexité de sa régulation et de ses multiples interactions avec d'autres hormones, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) semble être une cible de choix de la programmation fœtale (Figure 7). Les glucocorticoïdes sont, en effet, connus pour programmer les tissus *in utero*. Leur sécrétion débute très précocement au cours du développement embryonnaire. En concentration physiologique, les glucocorticoïdes fœtaux sont indispensables à la maturation de certains organes comme les poumons (Seckl, 2001). Cependant, une surexposition du fœtus à de fortes concentrations en glucocorticoïdes programme à long terme l'axe HHS (O'Regan *et al.*, 2001) De nombreuses études ont en

effet, montré que l'administration de glucocorticoïdes à des moments critiques du développement fœtal peuvent entraîner une déficience rénale, de l'hypertension, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline chez la descendance (Phillips *et al.*, 1998). D'autres facteurs sont également connus pour programmer à long terme l'activité de l'axe HHS : l'exposition maternelle ou fœtale à un stress, le comportement ou la dénutrition maternelle. En effet, une dénutrition maternelle de 50 % pendant la troisième semaine de gestation chez le rat augmente la concentration de corticostérone chez le fœtus à terme (Lesage *et al.*, 2001). Des altérations de l'expression du récepteur des glucocorticoïdes (GR) et de celui aux minéralocorticoïdes (MR), pourraient entraîner une reprogrammation du rétro-contrôle négatif des glucocorticoïdes sur l'axe HHS perturbant ainsi sa réponse au stress. Quand les taux de corticostérone sont maintenus artificiellement à des concentrations physiologiques, la dénutrition maternelle n'entraîne pas de perturbations de l'axe HHS. Ceci suggère que la dénutrition maternelle induit une surexposition du fœtus aux glucocorticoïdes maternels, ce qui programme l'axe HHS du nouveau-né (Lesage *et al.*, 2001). La dénutrition maternelle augmenterait également la sensibilité aux glucocorticoïdes de la descendance en perturbant leur expression cellulaire (Dutriez-Casteloot *et al.*, 2008). En effet, l'expression de la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase 1 (11 β -HSD1) est augmentée dans l'hippocampe, et le rapport 11 β -HSD1/11 β -HSD2 est diminué dans l'hypophyse alors que l'expression de MR est augmentée. Cette plus grande sensibilité, combinée à l'hypercorticostéronémie, contribuerait à l'apparition des pathologies métaboliques chez l'adulte.

De plus, grâce à leur caractère lipophile, les glucocorticoïdes peuvent traverser la barrière placentaire. Les glucocorticoïdes fœtaux ont donc deux origines potentielles : fœtale ou maternelle *via* le placenta. La 11 β -HSD2 semble avoir un rôle important dans le passage placentaire. Cette enzyme convertit les glucocorticoïdes actifs en forme inactive dans le placenta (Seckl, 2001). Cette action empêche l'augmentation des glucocorticoïdes actifs chez le fœtus. Cependant, 10 à 20 % des glucocorticoïdes maternels actifs passent quand même la barrière placentaire. En cas de stress, l'expression de la 11 β -HSD2 est diminuée, ce qui favorise par conséquent l'apport maternel de glucocorticoïdes actifs (Fowden and Forhead, 2004).

b. La programmation génétique

Dans une population évoluant dans les mêmes conditions, la prévalence du SM n'est pas la même en fonction des individus. Cette prévalence diffère également en fonction des ethnies. Ces données suggèrent l'existence d'une prédisposition génétique au SM. Des études semblent indiquer que des gènes tels que ceux de la 11 β -HSD1, de l'adiponectine ou du récepteur β -adrénergique prédisposeraient à l'apparition du SM (Kawamura *et al.*, 1999 ; Draper *et al.*, 2002 ; Heid *et al.*, 2006). Des séquençages de génome réalisés à grande échelle dans diverses populations ont permis de mettre en lumière des gènes impliqués dans l'homéostasie glucidique et la production d'insuline (Sánchez-Corona *et al.*, 2004 ; Rich *et al.*, 2004). L'*endothelial NitricOxide Synthase* (eNOS), connue pour faciliter la recapture du glucose dans le muscle squelettique, serait également impliquée dans la mise en place du SM. Des souris KO pour ce gène présentent en effet, des traits du SM telles que l'hypertension, la résistance à l'insuline ou l'hypertriglycéridémie (Razny *et al.*, 2010). La présence de variants du gène *fat mass and obesity associated* (FTO) est également associée au SM (Hotta *et al.*, 2011). Des gènes dont l'expression est liée à l'environnement nutritionnel sont d'autres candidats intéressants comme le *Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ* (PPAR γ) dont l'expression est intimement corrélée à la proportion de graisse du régime alimentaire quotidien (Luan *et al.*, 2001). Il interviendrait dans le développement du diabète de type 2 et du SM.

c. Les mécanismes épigénétiques

Il existe d'autres perturbations de l'expression génique qui ont lieu *in utero* et qui peuvent moduler le développement fœtal : les facteurs épigénétiques. En effet, il a été établi que l'épigénotype est sensible aux conditions environnementales durant l'embryogenèse. Il porte la mémoire des expositions précoces de la vie à des environnements sub-optimaux chimiques tels que l'apport en nutriments ou en substances toxiques, ou non comme les relations sociales et affectives. Ces différents environnements peuvent altérer l'expression des gènes de manière réversible ou irréversible (Waterland, 2009). La régulation épigénétique de

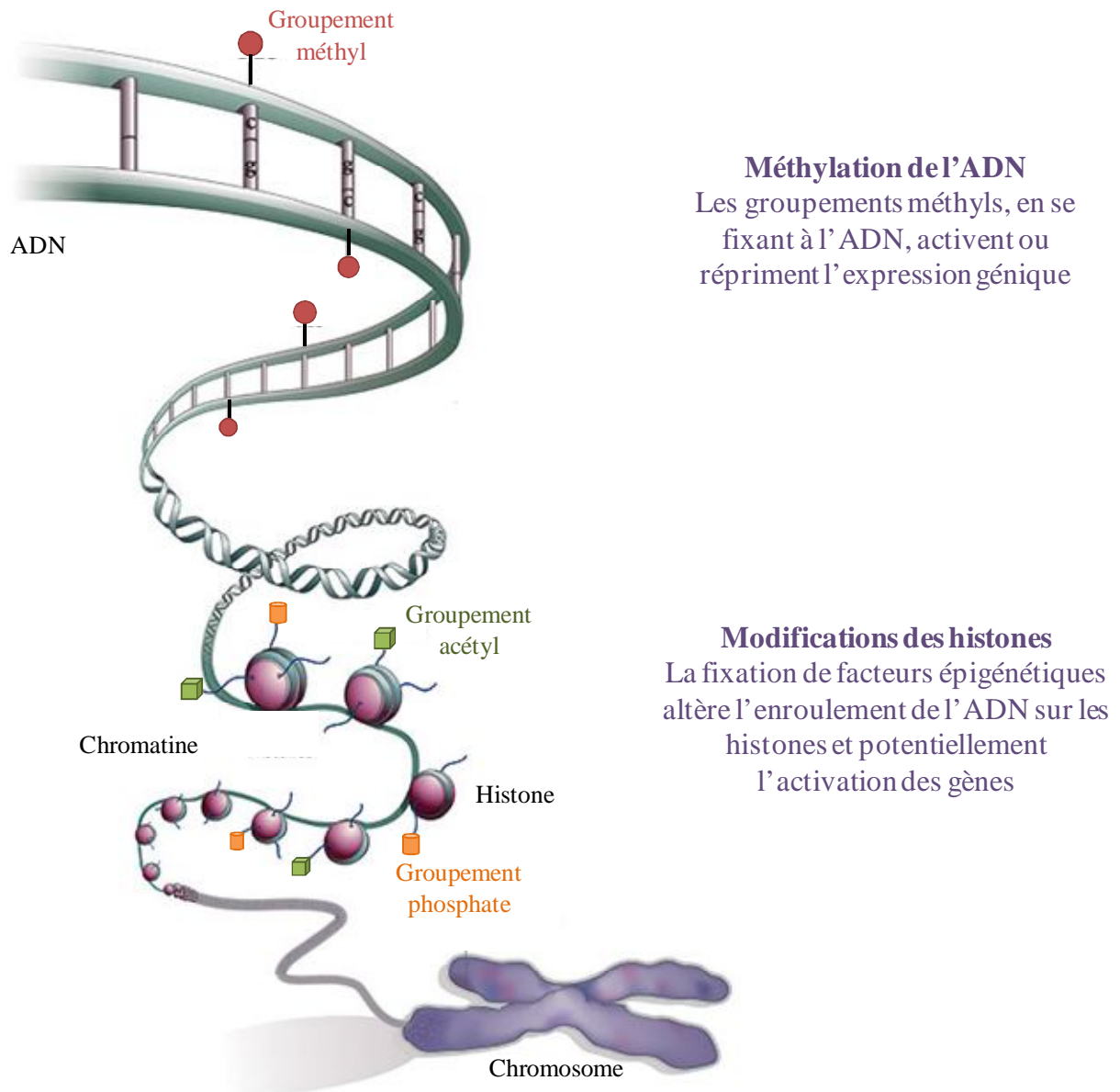


Figure 8 : Représentation schématique des principaux mécanismes de la régulation épigénétique. D'après Qiu (2006)

l'expression génique semblerait donc être un bon candidat pour expliquer le lien entre nutrition prénatale, expression génique et état physiologique de l'adulte (Jirtle and Skinner, 2007) pour revue (Parnet *et al.*, 2007).

L'épigénétique englobe les modifications mécaniques de l'ADN et des histones sans altérer la séquence nucléotidique de l'ADN. La modification épigénétique la plus caractéristique est la méthylation de l'ADN sur les résidus cystéines suivis d'une guanine : les dinucléotides CpG. Les regroupements de zones riches en CpG sont appelées îlots CpG. On les trouve généralement en position 5' et au niveau des séquences promotrices. Dans une cellule saine, ces îlots situés au niveau des promoteurs ne sont pas méthylés, sauf pour les gènes inactifs (Sulewska *et al.*, 2007). Dans le cas d'une régulation épigénétique, la méthylation des îlots crée un encombrement stérique ou favorise le recrutement de molécules au niveau de l'ADN, empêchant ainsi physiquement la fixation de facteurs de transcription au niveau de séquences promotrices (Waterland and Garza, 1999) (Figure 8). La transcription de l'ARN est donc inhibée. Ces modifications sont conservées au cours de la réplication de l'ADN grâce aux *DNA Méthyl-Transferases* (DNMT). De récentes études ont montré que l'environnement nutritionnel périnatal influence la mise en place voire le maintien de ces méthylations (Waterland and Garza, 1999). La méthylation de l'ADN dépend de l'ingestion par l'alimentation de groupes donneurs de méthyle et de cofacteurs impliqués dans la formation de la méthionine et qui peuvent intervenir dans le métabolisme fœtale (Waterland *et al.*, 2006). L'environnement nutritionnel précoce pourrait donc être fortement impliqué dans la régulation épigénétique du génome fœtal. Dans les cellules de mammifères, deux enzymes régulent le taux de méthylation. La S-adenosylmethionine (SAM) favorise la méthylation de l'ADN (Finkelstein, 1998), alors que la S-adenosylhomocysteine (SAH) l'inhibe (Brosnan and Brosnan, 2006).

Dans le noyau, l'ADN est présent sous forme d'une nucléoprotéine complexe appelée la chromatine. La chromatine est composée d'ADN enroulé autour d'histones. La régulation épigénétique peut également affecter ces histones (Figure 8). Les modifications covalentes qui en résultent, perturbent la structure du nucléosome. Les histones peuvent subir de nombreuses modifications post-traductionnelles réversibles telles que l'acétylation. Une fois de plus, ce sont ces modifications qui régulent l'expression génique en changeant l'accessibilité de la machinerie de transcription aux gènes. Elles jouent donc un rôle important en activant ou

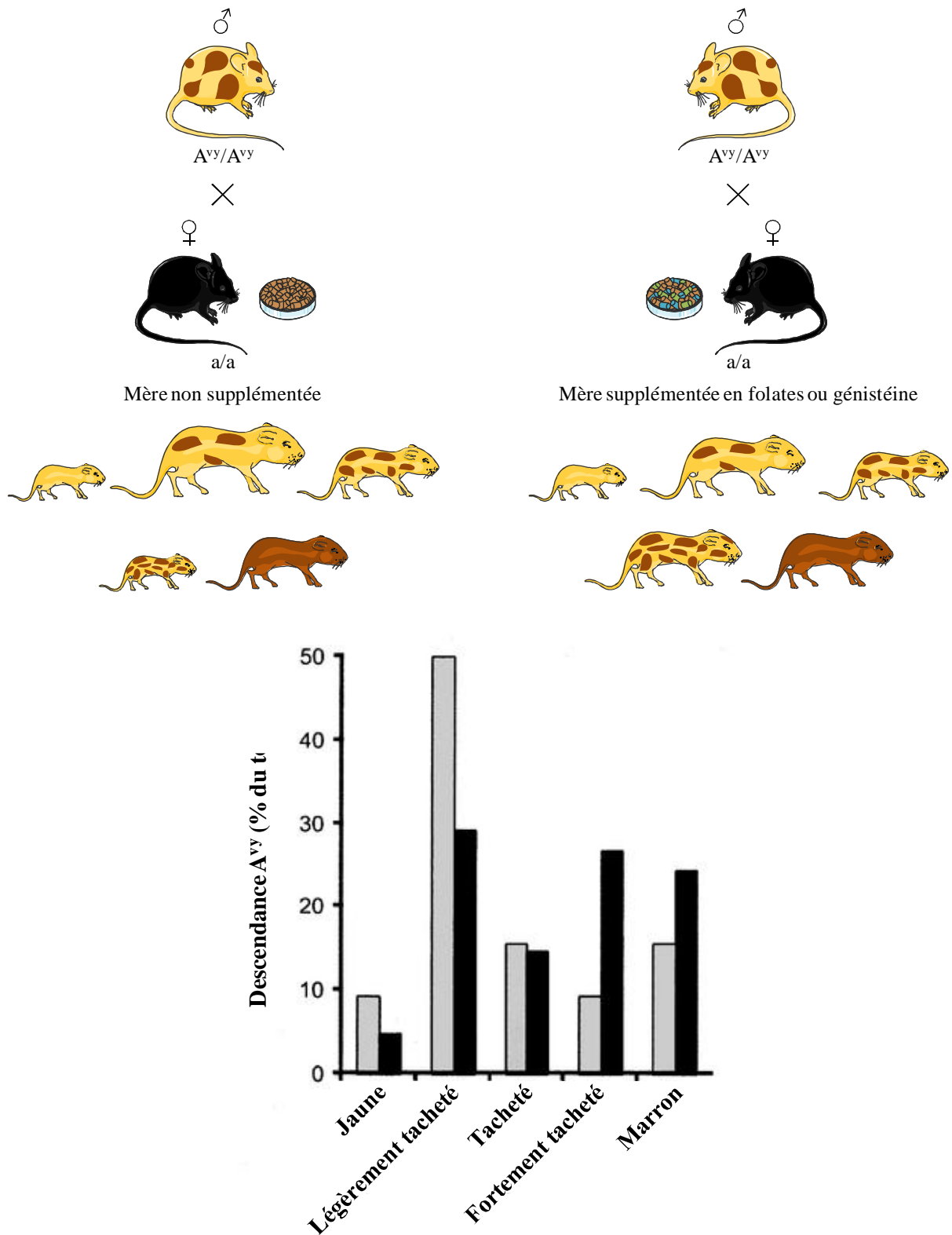


Figure 9 : Illustration des effets de la supplémentation en acide folique sur la répartition du pelage de la descendance. D'après Waterland et Jirtle (2003). Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

réprimant spécifiquement l'expression de gènes *via* le remodelage, la condensation ou la stabilisation de la chromatine.

L'équipe de Waterland a pu mettre en évidence le lien entre la nutrition prénatale et régulation épigénétique en étudiant l'expression de l'allèle A^{vy} (*agouti viable yellow*) du gène murin *agouti* (Waterland and Jirtle, 2003). Ce gène est responsable de la couleur jaune du pelage. Une mutation entraînant une perte de fonction, donne des souris homozygotes *a/a* au pelage noir. L'allèle A^{vy} résulte de l'insertion d'un rétrotransposon : *Intracisternal A Particle* (IAP) en position 5' du gène. Un promoteur cryptique se met alors en place dans la partie proximale de l'IAP et entraîne une expression ectopique du gène *agouti*. Cette région est naturellement fortement soumise à la régulation épigénétique : son taux de méthylation est inversement corrélé à l'expression ectopique du gène *agouti* créant ainsi de nombreuses variations de la coloration du pelage. Il est possible d'influencer cette méthylation par l'alimentation maternelle. En effet, la supplémentation en acide folique ou en génistéine chez la femelle *a/a* modifie la répartition des différents pelages chez la descendance (Wolff *et al.*, 1998 ; Waterland and Jirtle, 2003) (Figure 9). Ce type de régulation épigénétique par l'alimentation n'est pas transmissible à la génération suivante (Waterland *et al.*, 2007).

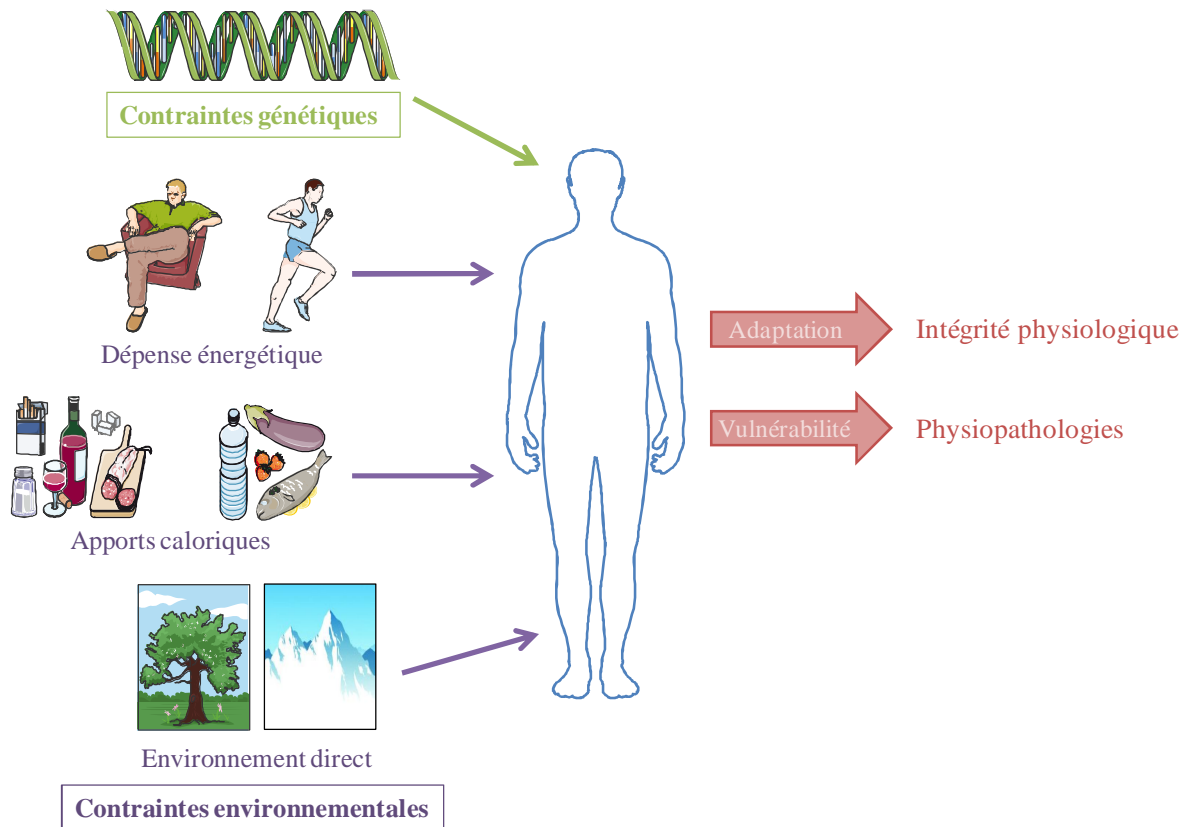


Figure 10 : Illustration de l'impact des contraintes extérieures sur la physiologie de l'individu. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

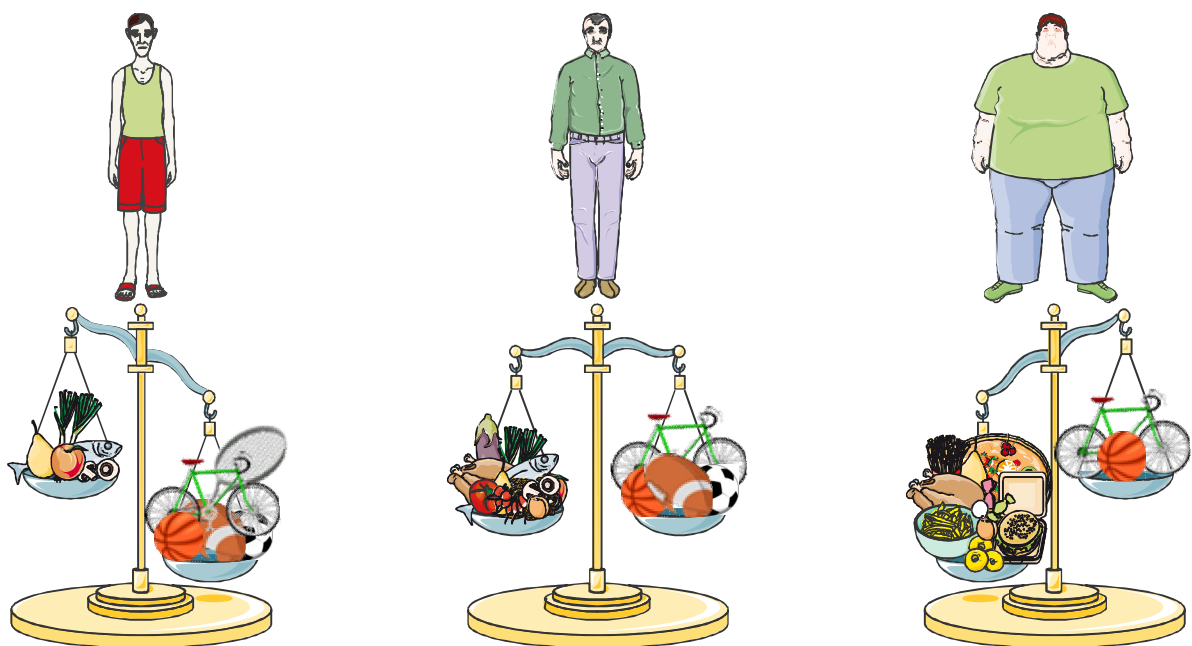


Figure 11 : Illustration des différents états possibles de la balance énergétique. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

III. Régulation de l'homéostasie énergétique

A. Schéma général

Initialement énoncé par Claude Bernard, le concept d'homéostasie est la capacité d'un système ouvert ou fermé à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes extérieures (Bernard, 1865) (Figure 10). L'homéostasie énergétique est définie comme l'état d'équilibre entre la dépense et l'apport énergétique qu'est la prise alimentaire, assurant ainsi la stabilité physiologique de l'organisme et permettant d'assurer le maintien d'un niveau donné de masse adipeuse. Selon des lois de thermodynamique, si la dépense énergétique est moins importante que son absorption, l'équilibre est rompu et le corps va stocker cet excès dans le tissu adipeux (Figure 11). La régulation de la prise alimentaire est alors très importante. Elle permet en effet, de moduler la partie apport énergétique de cette équation physiologique. Le comportement alimentaire ainsi que le stockage des réserves glucidiques et lipidiques sont contrôlés par un ensemble d'hormones ayant des effets à court terme et des signaux neuronaux aux effets à plus long terme. L'ensemble de ces signaux agit sur le système nerveux central, plus particulièrement au niveau de l'hypothalamus, véritable chef d'orchestre de la prise alimentaire et de la régulation homéostasique (Wilding, 2002). Le cerveau est en effet, capable d'établir un poids de référence de l'organisme et de mettre en œuvre tous les mécanismes pour le maintenir, en dépit des grandes variations évoquées sur le comportement alimentaire (Woods and D'Alessio, 2008). Dans la mesure où un déficit d'énergie pourrait compromettre la survie de l'individu, il n'est pas étonnant d'observer que les grandes voies métaboliques impliquées dans cette régulation favorisent l'augmentation de la prise alimentaire et diminuent la dépense énergétique quand les réserves s'amointrissent. Le comportement alimentaire est caractérisé par des épisodes discontinus de prise alimentaire. Il existe en effet, une variation circadienne de la prise alimentaire opposant une période de prise alimentaire en phase active et une période de jeûne en phase de sommeil. Ce caractère discontinu de la prise alimentaire s'oppose à l'utilisation continue de substrats énergétiques par les cellules. Ceci implique donc une orientation différente des flux énergétiques pendant les deux phases : stockage ou libération de substrats énergétique à partir des réserves. Le repas comprend trois phases : une phase pré-ingestive avec sensation de faim, suivi d'une phase

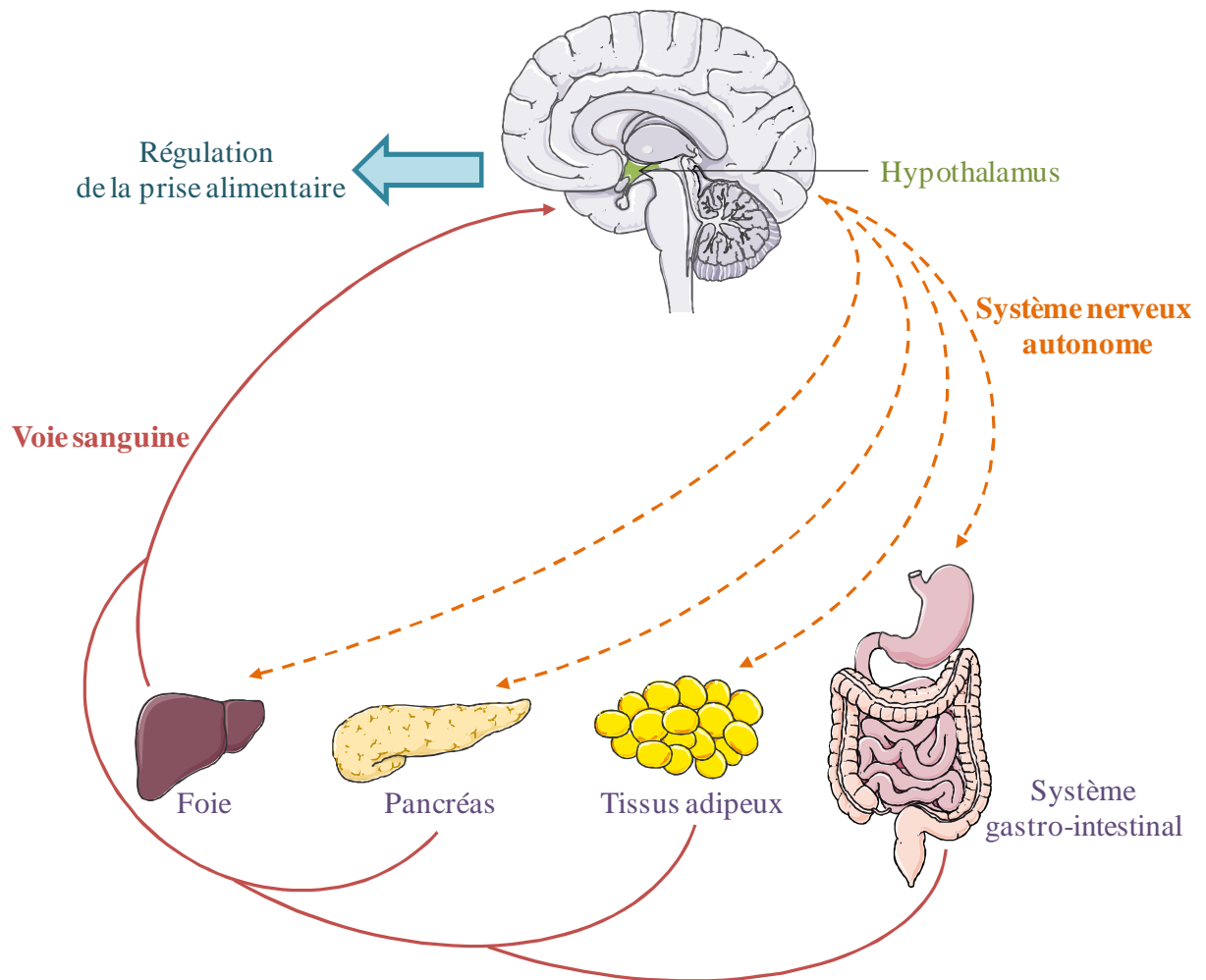


Figure 12 : Représentation schématique simplifiée de la boucle de régulation de la prise alimentaire. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

prandiale correspondant à la prise alimentaire et au processus progressif de rassasiement et enfin une phase postprandiale caractérisée par un état de satiété issue du tractus digestif et de durée variable, aboutissant à l'arrêt de la prise alimentaire chez un individu sain. La prise alimentaire est épisodique, l'intervalle entre deux prises alimentaires est un des facteurs régulant le niveau énergétique. La régulation de la prise alimentaire intervient à la fois sur la quantité d'aliments ingérés, phénomène de rassasiement, et sur la fréquence des repas, période de satiété. Cependant, l'homéostasie énergétique s'établit sur une moyenne de plusieurs jours et non sur un unique repas. Il existe donc une régulation sur le long terme, impliquant les phénomènes de stockage, lipogenèse et libération des réserves, lipolyse. Les notions opposant un centre de la faim et un centre de la satiété se sont compliquées avec la découverte d'un grand nombre de neuromédiateurs, de récepteurs et de populations neuronales impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Ces circuits neuronaux reçoivent par voie nerveuse et hormonale, des informations sur le statut énergétique de l'organisme permettant d'adapter avec une très grande précision les apports aux besoins.

Le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique résultent donc d'un dialogue entre les tissus périphériques et le cerveau, par voies nerveuses et hormonales (Figure 12). L'intégration au niveau de l'hypothalamus des signaux d'adiposité utilise une batterie de neuropeptides orexigènes et anorexigènes modulant en retour les voies cataboliques et anaboliques (Arora and Anubhuti, 2006). Cette régulation physiologique est également modulée par des facteurs psychologiques, sociaux et environnementaux qui peuvent en partie expliquer la fréquence de l'obésité.

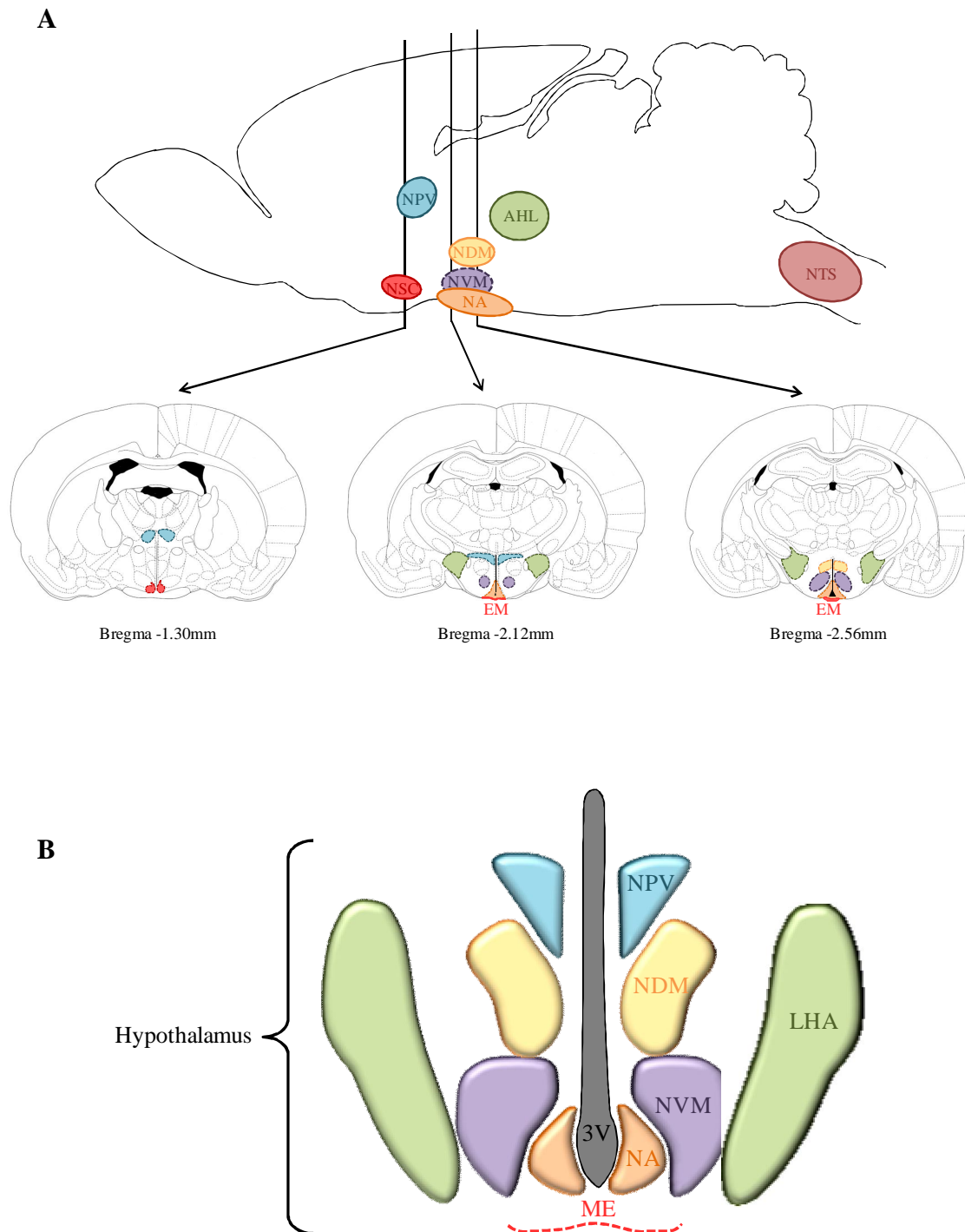


Figure 13 : **A** Disposition et **B** Représentation schématique des principaux noyaux hypothalamiques impliqués dans la prise alimentaire chez le rat

AHL : aire hypothalamique latérale ; EM : éminence médiane ; NA : noyau arqué ; NDM : noyau dorsomédian ; NPV : noyau paraventriculaire ; NSC : noyau suprachiasmatique ; NTS : noyau du tractus solitaire ; NVM : noyau ventromédian

B. Régulation de l'homéostasie énergétique par le système nerveux central

1. L'hypothalamus

a. Le noyau arqué

Le noyau arqué (NA) contrôle la prise alimentaire et intègre les signaux hormonaux lui permettant de réguler l'homéostasie énergétique (Funahashi *et al.*, 2000). En effet, l'inhibition de sa fonction, par injection de colchicine, augmente la prise alimentaire (Choi and Dallman, 1999). Le NA borde le troisième ventricule et repose sur l'éminence médiane, où la barrière hémato-encéphalique est formée de capillaires semi-perméables, permettant le passage d'hormones périphériques (Figure 13). Il occupe donc une position idéale pour intégrer les signaux hormonaux nécessaires à la régulation de l'homéostasie énergétique (Friedman and Halaas, 1998). Le NA s'étend de la partie antéro-postérieure du chiasma optique aux corps mamillaires. Ce noyau contient deux populations interconnectées de neurones de premier ordre :

- les neurones orexigènes produisant le neuropeptide Y (NPY) et l'*Agouti-Related Peptide* (AgRP) qui augmentent la prise alimentaire (Edwards *et al.*, 1999 ; Wilson *et al.*, 1999a)
- les neurones anorexigènes à Pro-OpiomélanoCortine (POMC) et *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript* (CART) (Schwartz *et al.*, 1997 ; Lambert *et al.*, 1998) (Figure 14).

Le noyau paraventriculaire (NPV) est adjacent à la partie supérieure du troisième ventricule, au niveau de l'hypothalamus antérieur (Figure 13). Ce noyau reçoit de nombreuses informations par des projections des neurones à NPY provenant du NA, à l'*α-melanocyte stimulating hormone* (α -MSH) dérivée de la POMC, à oréxine et à galanine qui stimule la prise alimentaire. Tout comme pour le NA, l'injection de colchicine, visant à bloquer la fonction du NPV, entraîne une hyperphagie ainsi qu'une augmentation du poids corporel (Choi and Dallman, 1999).

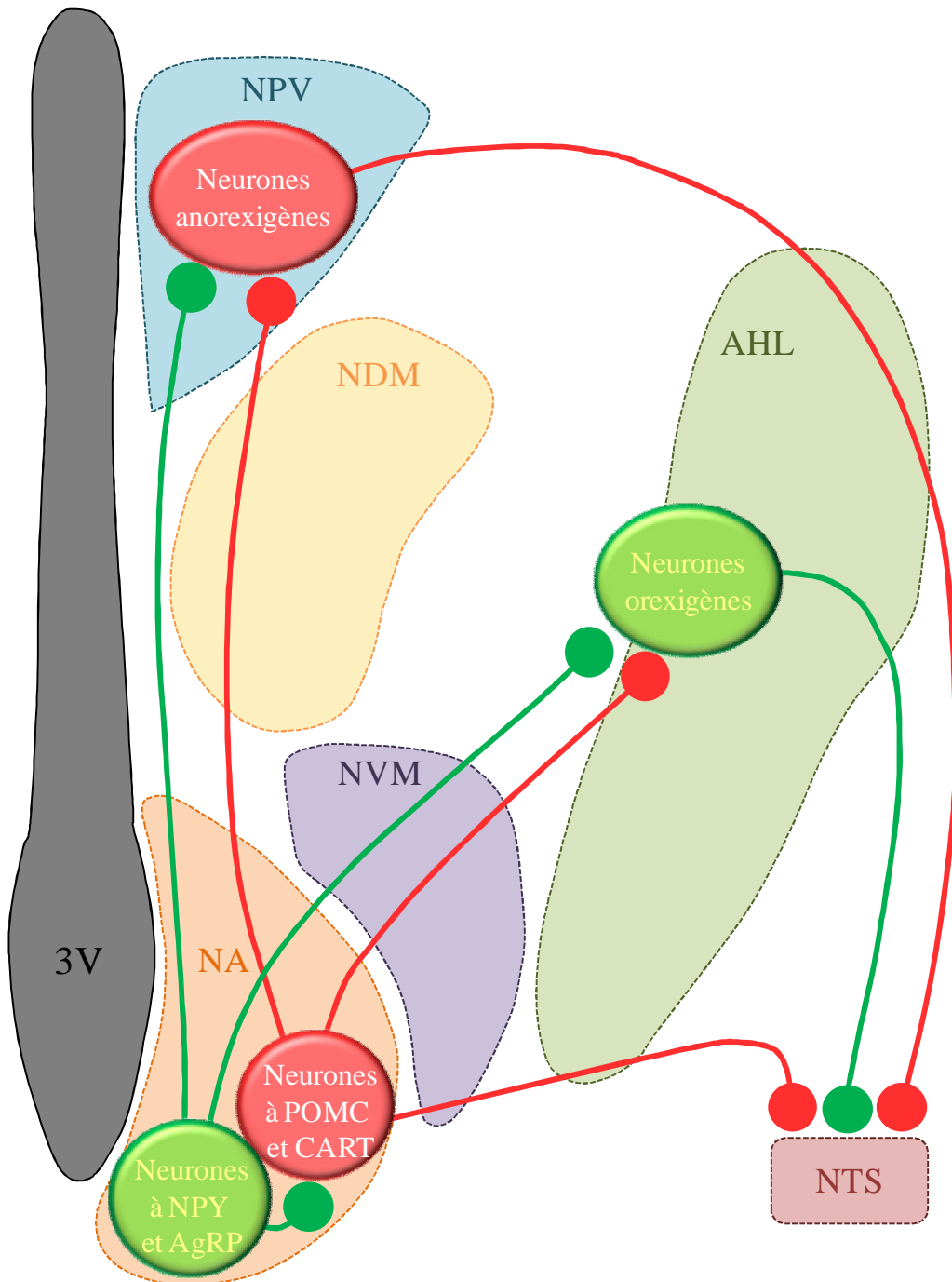


Figure 14 : Schéma des projections centrales des populations orexigènes et anorexigènes de l'hypothalamus

b. Le noyau paravenriculaire

Les projections du NA induisent d'autres changements neuroendocriniens *via* la régulation de l'expression de neurones de second ordre. Le NPV est en effet, le principal site de sécrétion de la *thyrotropin releasing hormone* (TRH) et de la *corticotropin releasing hormone* (CRH). Une injection intra-cérébroventriculaire (ICV) de TRH diminue la prise alimentaire (Suzuki *et al.*, 1982). De plus, les neuropeptides orexigènes du NA inhibent l'expression de TRH ; alors que les anorexigènes l'augmentent (Fekete *et al.*, 2002). Le NPV joue donc un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique *via* les axes thyroïdienne et corticotrope (Neary *et al.*, 2004).

c. Le noyau ventromédian

Le noyau ventromédian (NVM) intervient essentiellement dans la régulation de la satiété (Figure 13). C'est une des cibles principales de la leptine. Cette hormone, dont l'action sera approfondie par la suite, inhibe la prise alimentaire et stimule la libération des réserves énergétiques. Lors de lésions de ce noyau, on observe une hyperphagie ainsi qu'une prise de poids pouvant conduire à l'obésité (Satoh *et al.*, 1997). Le VMH est considéré comme le centre de satiété de l'hypothalamus.

d. Le noyau dorsomédian

Le noyau dorsomédian (NDM) envoie de nombreuses connexions vers les autres noyaux de l'hypothalamus et l'aire hypothalamique latérale (AHL) (Figure 14). C'est le lieu de convergence et de traitement des informations provenant de ces différents noyaux (Elmqvist *et al.*, 1998). La lésion du DMH induit une hypophagie (Bernardis and Bellinger, 1998).

e. L'aire hypothalamique latérale

L'AHL est connue comme le centre régulateur de la faim et de la soif. En effet, on observe une hyperphagie franche chez les sujets dont l'AHL a été lésée. Elle contient des populations de neurones sensibles au glucose, également présents dans le NA, activés en cas d'hypoglycémie *via* les voies afférentes du tronc cérébral (TC) (Bernardis and Bellinger, 1996). L'AHL intervient dans la régulation de la prise alimentaire *via* les systèmes catécholaminergiques et sérotoninergiques. Elle aurait également un rôle dans la répartition circadienne des repas et le dimorphisme sexuel du comportement alimentaire

f. Le tronc cérébral

Il existe un nombre très important de connexions entre l'hypothalamus et le TC, tout particulièrement au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS), traduisant un dialogue étroit et élaboré entre ces deux structures (Van der Kooy *et al.*, 1984). Le NTS présente de nombreux sites de liaison au NPY (Härfstrand *et al.*, 1986) dont les récepteurs Y1 et Y5 (Dumont *et al.*, 1998 ; Glass *et al.*, 2002) largement impliqués dans la médiation du rôle orexigène du NPY. Les taux de NPY extracellulaire varient en fonction des repas (Yoshihara *et al.*, 1996). Les neurones à NPY du NTS envoient des connexions vers le PVN (Sawchenko *et al.*, 1985). Les signaux de satiété consécutifs à un repas arrivent au NTS *via* le nerf vague (Williams *et al.*, 2001). Le TC interviendrait également dans la quantité de la prise alimentaire : il l'augmenterait tout en diminuant la fréquence des repas (Grill and Smith, 1988).

g. Le noyau suprachiasmatique

Le noyau suprachiasmatique (NSC) se situe de part et d'autre du 3^{ème} ventricule, juste au dessus du chiasma optique (Figure 13). Il contient de nombreux récepteurs aux hormones périphériques impliquées dans la régulation du métabolisme telles que la leptine (Håkansson *et al.*, 1998) ou l'insuline (Unger *et al.*, 1989). Comme nous avons pu le voir, le comportement alimentaire respecte un rythme circadien. En cas de lésion du NCS, la prise alimentaire devient continue (Nagai *et al.*, 1978). En effet, les perturbations du rythme

circadien de la prise alimentaire peuvent entraîner des troubles du comportement alimentaire et mener, à terme, à l'obésité (Leon and Roth, 1977).

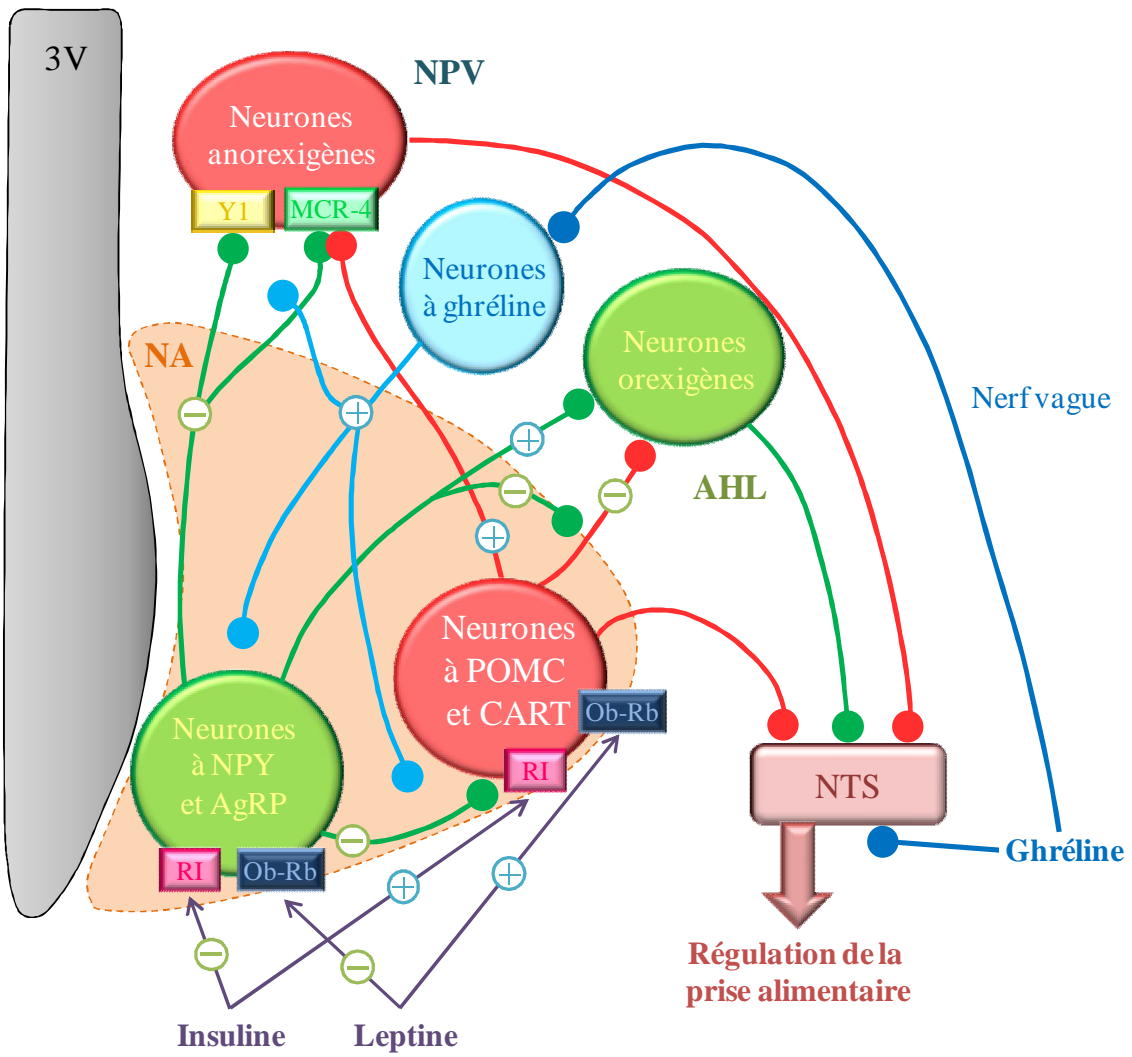


Figure 15 : Schéma de la régulation de la prise alimentaire au niveau du noyau arqué

2. Les peptides orexigènes produits par l'hypothalamus

a. Le neuropeptide Y

Le NPY est un neuropeptide de 36 acides aminés qui commence et se termine par une tyrosine (« Y » signifie tyrosine d'après le code à une lettre) (Williams *et al.*, 2001). C'est un des neuropeptides les plus abondants du système nerveux central. Il est majoritairement produit dans le NA (Figure 15). C'est également l'un des facteurs orexigènes les plus puissants de l'organisme. Bien que le NPY soit impliqué dans de nombreuses fonctions de l'organisme telles que la régulation cardiovasculaire, le contrôle des axes neuroendocriniens ou la mémoire (Pedrazzini, 2004), sa principale fonction reste la stimulation de l'appétit. En effet, une injection ICV de NPY augmente de manière significative et durable la prise alimentaire chez le rat (Clark *et al.*, 1984). Des injections chroniques de NPY vont quant à elles induire une hyperphagie et une réduction de la thermogénèse, qui combinées conduisent à terme à une obésité sévère (Stanley *et al.*, 1986). Les fortes concentrations de NPY mises en évidence dans un modèle animal d'obésité comme le rat Zucker, seraient à l'origine du phénotype observé (Dryden *et al.*, 1995).

Il existe 5 récepteurs au NPY liés aux protéines G : Y1 à Y5. Seuls les récepteurs Y1 et Y5 ont une action connue dans la régulation de l'appétit (Pedrazzini *et al.*, 1998). Le récepteur Y5 est majoritairement exprimé dans l'AHL près des sites potentiels de stimulation de l'appétit par le NPY (Williams *et al.*, 2000). La production de NPY est augmentée en cas de jeûne ou lorsque les réserves énergétiques sont faibles (Kalra *et al.*, 1991). Il augmente la prise alimentaire en stimulant directement les récepteurs Y1 et Y5 mais également en inhibant le signal anorexigène de la mélanocortine dans le NA (Kalra and Kalra, 2004). Il existe un rythme circadien de l'expression du NPY qui correspond à ceux de peptides périphériques impliqués dans la prise alimentaire tels que la leptine anorexigène ou la ghréline orexigène (Kalra and Kalra, 2004). On observe une augmentation du NPY dans les modèles animaux dérégulant le métabolisme énergétique, de diabète insulino-dépendant et non-insulino-dépendant (Inui, 2000). Les neurones à NPY activés par le jeûne sont ceux exprimant la forme longue du récepteur à la leptine (Baskin *et al.*, 1999). Le NPY permettrait de restaurer l'équilibre de la balance énergétique en condition de déficit énergétique. Cependant, des souris KO pour le gène NPY ne présentent pas d'altération de la prise alimentaire ni

d'augmentation de leur poids corporel (Beck, 2001). Ces résultats suggèrent l'existence d'un système compensatoire qui prendrait le relais en cas d'altération du système NPY. L'*agouti-related peptide* (AgRP) semble être un bon candidat pour ce relais.

b. L'agouti-related peptide

L'AgRP est un peptide de 132 acides qui intervient dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel (Wilson *et al.*, 1999b). L'AgRP possède une forte homologie de séquence avec le produit du gène *agouti* responsable de la couleur du pelage chez la souris. L'agouti est exprimé dans tout le corps de la souris *Agouti yellow* et provoque l'apparition d'un pelage jaune, d'une résistance à l'insuline, une hyperglycémie, le tout aboutissant à un état d'obésité, ainsi qu'une augmentation de la taille des souris. Chez l'Homme, le gène *agouti* est exprimé dans le tissu adipeux (Mynatt *et al.*, 1997). Dans le cerveau, l'AgRP est uniquement exprimé dans le NA de l'hypothalamus (Figure 15). Les neurones le produisant co-sécrètent également le NPY et projettent vers le NPV ou le NDM. Tout comme le NPY, l'AgRP est augmenté quand le signal leptine est diminué suite à un jeûne ou une mutation (Wilson *et al.*, 1999b). L'AgRP est un puissant antagoniste des récepteurs à la mélanocortine MCR-3 et MCR-4 impliqués dans la régulation de la balance énergétique (Yang *et al.*, 1999). Cette inhibition peut conduire à un phénotype d'obésité associé à une hyperphagie et une diminution de la thermogénèse. L'administration centrale d'AgRP augmente la prise alimentaire jusqu'à une semaine chez le rat (Rossi *et al.*, 1998), injectée de manière chronique, elle conduit au phénotype d'obésité (Small *et al.*, 2001).

c. La melanin-concentrating hormone

La *melanin-concentrating hormone* (MCH) est un neuropeptide cyclique de 19 acides aminés. Il est clivé à partir de son précurseur : la prépro-MCH qui donne également d'autres peptides à la fonction non clairement définie (Segal-Lieberman *et al.*, 2006). Les neurones contenant la MCH sont essentiellement concentrés dans l'AhL (Inui, 2000). La MCH a initialement été découverte chez le saumon en tant de régulateur des changements de couleur

de leur peau (Kawauchi *et al.*, 1983). La MCH agit *via* deux récepteurs couplés aux protéines G : MCH-1R et MCH-2R à plus haute affinité. Ces récepteurs sont largement distribués dans les différentes régions du cerveau notamment dans l'hippocampe, l'amygdale et le cortex cérébral. Le récepteur MCH-1R est exprimé dans les cellules de l'hypophyse sécrétant l'hormone de croissance GH, suggérant que la MCH pourrait intervenir dans la régulation de la sécrétion de la GH (Segal-Lieberman *et al.*, 2006). De nombreuses études suggèrent que la MCH régule la masse pondérale chez les mammifères. En effet, une injection ICV de MCH chez le rat augmente la prise alimentaire et diminue la dépense énergétique. Chez des souris *ob*^{-/-} obèse n'ayant pas de leptine fonctionnelle, on observe une surexpression de la MCH dans des conditions de jeûne ou *ad libitum*. Des souris MCH^{-/-} prennent moins de poids que des souris témoins et souffrent de maigreur résultant de leur hypophagie (Shimada *et al.*, 1998). De la même façon, des souris *knock-out* (KO) pour le gène codant le récepteur MCH-1R sont résistantes aux régimes *High-Fat* (HF) censés induire un état d'obésité (Kokkotou *et al.*, 2005). Une surexpression de MCH entraîne également une intolérance au glucose ainsi qu'une résistance à l'insuline, indépendamment de ces effets sur l'adiposité du sujet (Ludwig *et al.*, 2001). L'ensemble de ces résultats suggère une implication de la MCH dans le développement de l'obésité.

d. Les oréxines

Les oréxines A et B, également appelées hypocrétines, sont des neuropeptides de respectivement 33 et 28 acides aminés. Elles sont situées dans les neurones des aires latérales et dorsales de l'hypothalamus (Sakurai *et al.*, 1998). Les oréxines activent deux types de récepteurs couplés aux protéines G : les récepteurs à l'oréxine 1 (ROX1) et oréxine 2 (ROX2). Alors que l'oréxine A présente une forte affinité pour les deux récepteurs, l'oréxine B a une affinité plus importante pour le ROX2. ROX1 est largement exprimé dans l'hypothalamus, notamment dans le NA et le NVM, et ROX2 dans le NPV. L'injection d'un antagoniste spécifique de ROX1 supprime la prise alimentaire, et avance la sensation de satiété (Rodgers *et al.*, 2002). L'oréxine A augmenterait donc la prise alimentaire en dissipant les effets satiétogènes, et ce de manière dose dépendante. L'expression génique des oréxines est sélectivement activée par un déficit nutritionnel sévère suite à un jeûne ou une

hypoglycémie induite par l'augmentation du taux d'insuline dans le sang. Les oréxines augmenteraient la prise alimentaire en utilisant les mêmes voies de signalisation que le NPY.

Les neurones à oréxines envoient des connexions à travers tout le SNC, notamment dans les aires de régulation neuroendocrinienne de l'état veille/sommeil. Une injection ICV d'oréxine A, pendant la phase lumineuse, augmente la prise alimentaire alors qu'en phase nocturne, son action est masquée par celle du NPY (Haynes *et al.*, 1999). Il semblerait donc que les oréxines soient impliquées dans la variation du rythme circadien plutôt que dans le contrôle de la régulation de la prise alimentaire. En effet, l'administration centrale d'oréxines augmente l'activité de l'électro-encéphalogramme du sujet et l'activité locomotrice éveillée (Willie *et al.*, 2001). De par leur interaction avec l'hypothalamus et leur régulation par les facteurs circadiens et nutritionnels, les oréxines semblent être le lien entre les états de veille/sommeil et l'homéostasie énergétique (Sakurai, 2005).

Les oréxines sont également exprimées en périphérie dans les cellules endocriniennes de la muqueuse gastrique, l'intestin et le pancréas. L'administration périphérique d'oréxines augmente la concentration sanguine d'insuline (Nowak *et al.*, 2005)

e. La galanine

La galanine est un neuropeptide de 29 acides aminés, n'appartenant à aucune famille de peptides connue à ce jour. Elle est principalement exprimée dans l'intestin grêle et le cerveau notamment dans le NA, le NDM, le NPV et le tronc cérébral. Dans l'hypothalamus, elle régule notamment la balance énergétique et l'équilibre hydrique (Leibowitz, 1998). Une administration centrale de galanine augmente la consommation de nourriture riche en graisse. Effectuées sur plusieurs jours chez le rat, ces injections augmentent la prise alimentaire de jour, que ce soit sous régime hyperlipidique HF ou standard. Cependant, cette augmentation est compensée par une forte diminution de la prise alimentaire en période nocturne (Smith *et al.*, 1994). L'injection chronique de galanine n'augmenterait donc pas la prise alimentaire sur 24h, ni la prise de poids chez le rat. Un inhibiteur du récepteur à la galanine inhibe ses effets mais ne module pas la prise alimentaire (Corwin *et al.*, 1995). Ces résultats semblent indiquer l'existence d'un mécanisme parallèle qui prendrait le relais de la galanine en cas d'inhibition.

f. Les opioïdes endogènes

Le système opioïde est composé de trois familles de peptides actifs : les β -endorphines, les dynorphines et les enképhalines. Les peptides opioïdes sont retrouvés notamment dans le NA. Ils sont responsables de la sensation de faim et de la prise alimentaire (Baile *et al.*, 1986). Une injection centrale de β -endorphine, dérivée du précurseur de la POMC, ou de dynorphine stimule la prise alimentaire (Baile *et al.*, 1986). Une administration chronique d'antagoniste des opioïdes chez le rat obèse tel que le naloxone, diminue la prise alimentaire ainsi que la prise de poids (Baile *et al.*, 1986). La β -endorphine quant à elle diminue l'activité du nerf sympathique dans le tissu adipeux brun (TAB), ce qui aurait un rôle potentiel dans la thermogénèse (Egawa *et al.*, 1993).

g. Les endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes agissent *via* au moins deux récepteurs : les récepteurs aux endocannabonoïdes 1 (CB1) et 2 (CB2). Ces récepteurs sont situés dans le centre du SNC dédié au plaisir, mais également dans des régions de régulation de la balance énergétique telles que l'hypothalamus ou le tractus gastro-intestinal (Wenger and Moldrich, 2002). Dans de nombreuses espèces notamment chez l'homme, l'administration de cannabinoïdes endogènes ou exogènes augmente la prise alimentaire voire la prise de poids corporel. Ces effets semblent être médiés par CB1 (Vickers and Kennett, 2005). Les endocannabinoïdes agiraient de concert avec la leptine, la ghréline et la mélanocortine (Fride *et al.*, 2005). En effet, la leptine réduirait les taux d'endocannabinoïdes dans l'hypothalamus chez le rat (Di Marzo *et al.*, 2001). Le rimonabant, un antagoniste sélectif de CB1, réduit la prise alimentaire et la prise de poids chez le rat. Cet effet est encore plus marqué chez un rat atteint d'obésité (Vickers and Kennett, 2005).

3. Les peptides anorexigènes produits par l'hypothalamus

a. Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript

Le *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript* (CART) est un puissant neuropeptide anorexigène. Il existe 92 % d'homologie de séquence entre l'ARN messenger (ARNm) de l'Homme et du rat. Sa haute conservation entre les espèces suggère l'importance de son rôle dans la régulation du métabolisme énergétique (Murphy, 2005). CART est retrouvé dans de nombreux noyaux de l'hypothalamus dont le NPV et la LHA (Couceyro *et al.*, 1997). Il semblerait qu'il soit impliqué dans de nombreux domaines dont la régulation endocrinienne de la prise alimentaire. En effet, une injection ICV de CART supprime la prise alimentaire chez le rat (Lambert *et al.*, 1998). Son expression est à l'inverse, significativement diminuée dans le NA chez des rats à jeun. On observe également une diminution de l'expression de l'ARNm de CART chez les souris *ob^{-/-}* déficientes en leptine. De la même façon, la leptine augmente le taux d'ARNm de CART dans le NA (Kristensen *et al.*, 1998). De plus, CART est colocalisé dans les neurones hypothalamiques avec les récepteurs à la leptine. Il existerait donc un lien entre les voies de signalisation de CART et de la leptine. Toutefois, bien que le rôle de CART dans la régulation de la prise alimentaire soit clairement observé, les souris KO pour ce gène ne présentent pas d'altération du comportement alimentaire (Asnicar *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes de compensation en l'absence du signal CART.

b. Les mélanocortines

Les mélanocortines sont des peptides bioactifs, clivés à partir de la POMC de manière tissu spécifique. En effet, le clivage de la POMC dépend des Prohormones Convertases (PC) présentes dans la cellule (Zhou *et al.*, 1993). L'hypophyse antérieure contient PC1 qui clive la POMC en ACTH. PC2 quant à elle, clive l'ACTH en α -MSH dans le lobe intermédiaire et dans le SNC. L' α -MSH sert de ligand endogène dans l'hypothalamus au récepteur MCR-4 impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique (Pritchard *et al.*, 2002). Une injection ICV d' α -MSH inhibe la prise alimentaire et diminue la prise de poids. L' α -MSH est l'inhibiteur endogène de l'AgRP dont elle annule les effets stimulateurs

sur la prise alimentaire (Rossi *et al.*, 1998). Les souris surexprimant l'AgRP tout comme les animaux KO pour le récepteur MC4 souffrent d'hyperphagie, sont obèses et insensibles à l'action de l' α -MSH (Huszar *et al.*, 1997). Une mutation fonctionnelle du récepteur MC4 est à l'origine du phénotype d'obésité monogénique.

c. Le corticotropin releasing factor

Le *Corticotropin Releasing Factor* (CRF) est une neurohormone de 41 acides aminés, essentiellement connue pour réguler la sécrétion d'ACTH. Cependant, des études montrent que le CRF serait également un facteur anorexigène endogène et interviendrait dans la thermorégulation (Richard *et al.*, 2002). Le CRF agit *via* 2 récepteurs : CRF1 et CRF2 (Turnbull and Rivier, 1997). L'injection ICV de CRF dans le NPV inhibe la prise alimentaire en l'absence de stress (Crespi *et al.*, 2004). En effet, les glucocorticoïdes libérés en situation de stress pour l'organisme, augmentent la prise alimentaire en inhibant le CRF et en stimulant la voie du NPY. Injecté de manière chronique, il provoque l'anorexie et la perte progressive de poids (Schwartz *et al.*, 1995). L' α -hélicale CRF (9-41), un antagoniste du récepteur CRF1, augmente la prise alimentaire (Crespi *et al.*, 2004). La *StressCoPin* (SCP) et le *Stresscopin-Related Peptide* (SRP) sont deux ligands endogènes du récepteur CRF2. Ces deux molécules sont connues pour être impliquées dans la réponse anorexigène.

d. La neurotensine

La neurotensine (NT) est un peptide de 13 acides aminés (Carraway and Leeman, 1973). Il existe trois récepteurs à la neurotensine : NT1 à 3 fortement conservés entre les espèces (Cusack *et al.*, 1995). La NT est produite dans le NA, le NPV et le NDM de l'hypothalamus. Son injection ICV dans le NPV diminue la prise alimentaire (Kalra *et al.*, 1999). La leptine stimule la production de NT et diminue donc la prise alimentaire (Beck *et al.*, 1998). Il semblerait donc que l'action centrale de la leptine soit en partie médiée par la NT.

e. La sérotonine

Contrairement aux autres peptides précédemment énoncés, la sérotonine (5HT), une monoamine, est produite dans le noyau du raphé. Elle envoie ses connexions vers l'hypothalamus, tout particulièrement vers le NPV et le NVM. Elle intervient dans de nombreux processus physiologiques dont la régulation du comportement, du sommeil, de la température corporelle et la perception de la douleur mais son principal rôle est le contrôle de l'appétit. Elle serait tout particulièrement impliquée dans les mécanismes de satiété et de fin de satiété. Parmi les nombreux récepteurs de la 5HT, ce seraient les récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2C} qui seraient impliqués dans la satiété (Halford *et al.*, 2007). En effet, la sérotonine inhibe la prise alimentaire lorsqu'elle est administrée aussi bien en central qu'en périphérie (Leibowitz, 1989). Elle diminue la prise de poids et augmente la dépense énergétique. De plus, les souris KO pour le récepteur 5-HT_{2C} sont obèses (Tecott *et al.*, 1995).

C. La régulation de l'homéostasie énergétique par la périphérie

1. Le signal orexigène de la périphérie : la ghréline

La ghréline est une hormone de 28 acides aminés. Elle est essentiellement produite par les cellules endocrines de la muqueuse gastrique, mais on la retrouve dans de nombreux tissus dont l'hypothalamus et le pancréas (Hubina *et al.*, 2005). Elle est présente dans l'organisme sous deux formes : une forme inactive non modifiée et une forme active octanoylée. À ce jour, c'est le seul signal périphérique orexigène connu (Nakazato *et al.*, 2001). Elle agit *via* le récepteur *GH secretagogue receptor 1a* (GHSR1a), prédominant dans l'hypophyse et dans une moindre mesure dans l'hypothalamus, le tissu adipeux et de nombreux autres tissus. La ghréline va donc stimuler la libération de GH, mais également de prolactine et d'ACTH ce qui va augmenter les taux de glucocorticoïdes et d'aldostérone (Arvat *et al.*, 2001). Les taux importants de ghréline dans l'estomac laissent suggérer que cette hormone aurait un rôle dans la régulation de l'appétit (Kojima *et al.*, 1999). La ghréline augmente en effet, la prise alimentaire et la prise de poids en stimulant la production de NPY et d'AgRP dans le NA, inhibant ainsi les effets anorexigènes de la leptine (Shintani *et al.*, 2001). Chez l'Homme, sa

concentration augmente durant un jeûne ou en cas de diminution des réserves énergétiques et diminue après le repas (Ariyasu *et al.*, 2001). Cette augmentation pré-prandiale de ghréline pourrait être un des signaux initiateurs de la prise alimentaire (Cummings *et al.*, 2001).

2. Les signaux anorexigènes produits par la périphérie

a. Le peptide YY

Le peptide YY (PYY) est composé de 36 acides aminés. Il appartient à la famille des polypeptides pancréatiques qui contient notamment le NPY (Conlon, 2002). Le PYY est produit par les cellules L de l'intestin. On le trouve en grande quantité au niveau du tractus gastro-intestinal (Ekblad and Sundler, 2002). Il existe 2 formes majoritaires de PYY circulant : le PYY₁₋₃₆ et le PYY₃₋₃₆. Comme le NPY, le PYY agit sur les récepteurs Y et tout particulièrement le récepteur Y₂ (Larhammar, 1996). Le PYY est libéré suite à la prise alimentaire. On observe un pic de son taux plasmatique en phase postprandiale (Adrian *et al.*, 1985). La concentration de PYY est proportionnelle à l'énergie du repas ingéré (Lin and Chey, 2003). L'injection périphérique de PYY₃₋₃₆ inhibe la prise alimentaire, diminue la prise de poids chez le raton (Batterham *et al.*, 2002) et améliore le contrôle de la glycémie chez le raton diabétique (Pittner *et al.*, 2004). La réduction de la taille des repas, et donc la réduction calorique, constatée s'accompagne d'une diminution de la sensation de faim sans altération de la vidange gastrique (Batterham *et al.*, 2002). *A contrario*, une souris KO pour le PYY devient hyperphagique et développe par conséquent un phénotype d'obésité. Ces altérations sont inversées par une injection de PYY₃₋₃₆ (Batterham *et al.*, 2006). Au niveau central, le PYY₃₋₃₆ semble donc exercer un important rétro-contrôle sur les circuits hypothalamiques. *Via* son action sur le récepteur présynaptique Y₂, le PYY inhibe les neurones à NPY et pourrait activer ceux à POMC (Batterham *et al.*, 2002).

b. La cholecystokinine

La cholécystokinine (CCK) est un peptide présentant différentes formes bio-actives : CCK58, CCK33 et CCK8. Il existe deux types de récepteurs à la CCK : CCKA et CCKB (Moran, 2000). Le récepteur CCKA présente deux états fonctionnels : le premier de faible affinité et le second de haute affinité. Il a été montré que l'activité de la CCK est médiée par la forme de faible affinité (Moran, 2000). Or, au vu de sa faible concentration plasmatique, si la CCK avait une activité endocrinienne, elle ne pourrait activer que des sites à haute affinité. Il semblerait donc que la CCK ait une activité paracrine voire neuroendocrine pour réguler la satiété (Moran, 2000). La CCK diminue en effet, la taille et la durée du repas chez l'animal comme chez l'Homme (Kissileff *et al.*, 1981). Elle n'a cependant, pas d'effet si elle est injectée 15 minutes avant le repas, puisqu'elle possède d'une demi-vie très courte d'une à deux minutes (Gibbs *et al.*, 1973). Des souris déficientes en récepteurs CCKA souffrent d'hyperphagie responsable de leur obésité (Weiland *et al.*, 2004). Le rôle de la CCK est médié, au moins en partie, par le nerf vague jusqu'au TC (Chen *et al.*, 2008).

c. La leptine

La leptine est une hormone découverte en 1994 par Zhang et ses collaborateurs, à l'aide d'un modèle de souris obèse (Zhang *et al.*, 1994). La leptine est produite par le gène *ob*. C'est une protéine de 18 kDa contenant une séquence signal qui sera clivée pour donner l'hormone mature de 16 kDa soit 167 acides aminés. Cette hormone est majoritairement produite par les adipocytes blancs. Elle est considérée comme le reflet de la masse adipeuse de l'organisme (Frederich *et al.*, 1995 ; Maffei *et al.*, 1995). Cependant, l'expression de son message a depuis été mise en évidence dans le muscle squelettique (Wang *et al.*, 1998), l'utérus, la glande mammaire, l'hypophyse, le placenta (Bi *et al.*, 1997) et l'estomac (Bado *et al.*, 1998).

La mutation du gène *ob* se traduit par l'absence de leptine circulante, ce qui conduit à un phénotype d'obésité chez la souris *ob/ob*. Ces souris présentent également une hyperinsulinémie, une hyperglycémie et une hypothermie. Ces symptômes ressemblent à ceux d'une obésité morbide chez l'Homme. Le poids de ces souris est triplé, et leur masse adipeuse quadruplée par rapport au souris sauvages (Friedman and Halaas, 1998). Ce phénotype peut

être inversé par l'injection de leptine (Halaas *et al.*, 1995). *Ob* est donc l'un des gènes impliqués dans l'obésité d'origine monogénique, qui représente 5 % des patients obèses.

En 1995, une équipe découvre le gène *db* codant le récepteur à la leptine (Tartaglia *et al.*, 1995). Il existe six variants du récepteur à la leptine : Ob-Ra à Ob-Rf au domaine intra-cellulaire variable (Chen *et al.*, 1996). Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs cytokines qui utilisent la voie de signalisation JAK-STAT. Ils peuvent être classés en trois familles : les formes courtes, longues et sécrétées (Tartaglia, 1997). La forme Ob-Rb diffère des autres récepteurs par son long domaine intra-cellulaire. Ce récepteur est essentiellement retrouvé dans le NA, le NPV, le NDM et l'AHL. La fixation de la leptine sur la partie extracellulaire de Ob-Rb induit la dimérisation du récepteur et active, entre autres, les protéines kinases JAK. Il en résulte la phosphorylation et la dimérisation du *Signal Transduction and Activators of Transcription 3* (STAT3). Le dimère pSTAT3 est alors transloqué vers le noyau et agit sur différentes voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prise alimentaire (Figure 16). La leptine va alors inhiber les peptides orexigènes : le NPY, la MCH, les oréxines et l'AgRP, et en parallèle stimuler la production de peptides anorexigènes que sont l' α -MSH, CART et la CRH (Jéquier, 2002). Il en résulte donc une diminution de la prise alimentaire et la mobilisation des réserves énergétiques. Les souris *db/db* ayant une mutation dans la partie intra-cellulaire du récepteur Ob-Rb, présentent les mêmes symptômes que les souris *ob/ob*. Elles sont de plus incapables d'emprunter la voie de signalisation JAK-STAT (Meister, 2000). Le domaine intra-cellulaire du récepteur est donc responsable de l'activité physiologique de la leptine sur la régulation de l'appétit (Lee *et al.*, 1996). Il semblerait donc que ce soit la forme longue Ob-Rb qui transmette le signal de la leptine.

La leptine circulante est transportée vers l'hypothalamus et passe la barrière hémato-encéphalique (Banks *et al.*, 1996). Il semblerait que ce soit la forme tronquée du récepteur : le récepteur Ob-Ra qui soit responsable de ce transport saturable (Banks *et al.*, 1996). Le jeûne diminue ce transport, tandis que la reprise alimentaire l'augmente (Kastin and Pan, 2000). La régulation du transport de la leptine pourrait être un modulateur important des effets de la leptine sur la prise alimentaire. Les formes courtes du récepteur ont un rôle supposé dans son transport à travers la barrière hémato-encéphalique (El-Haschimi *et al.*, 2000). La forme sécrétée quant à elle, se fixerait à la leptine circulante pour inhiber son activité biologique.

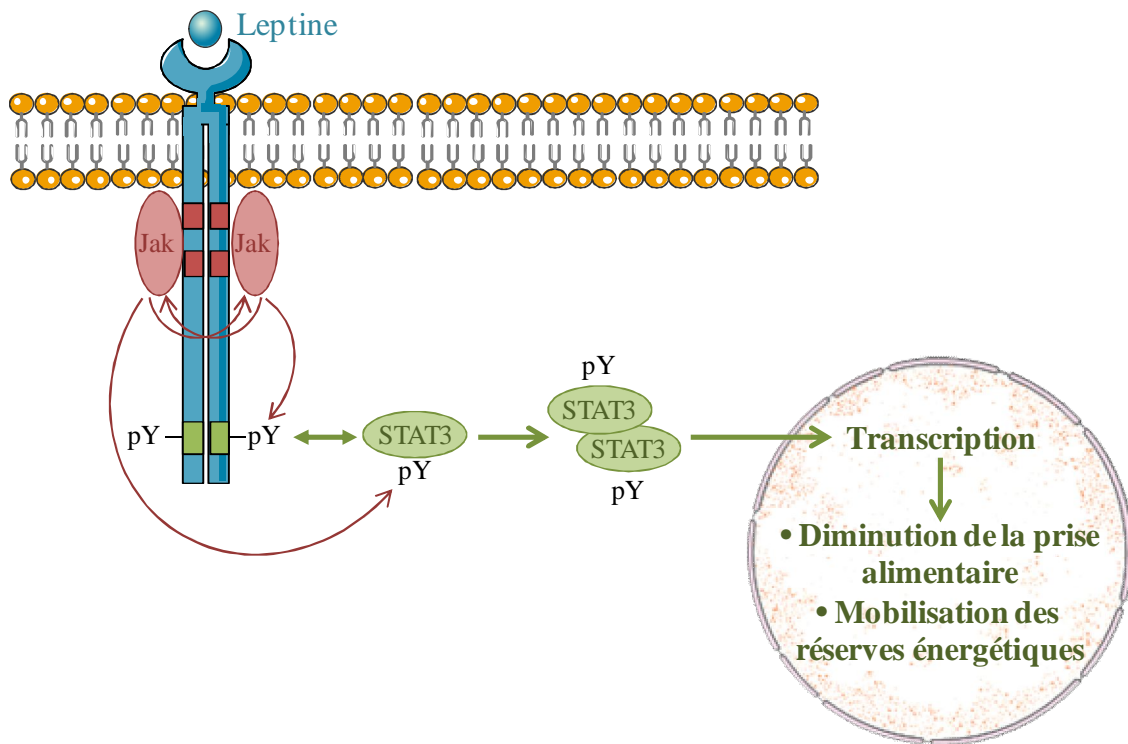


Figure 16 : Schéma de la voie de signalisation intracellulaire de la leptine. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

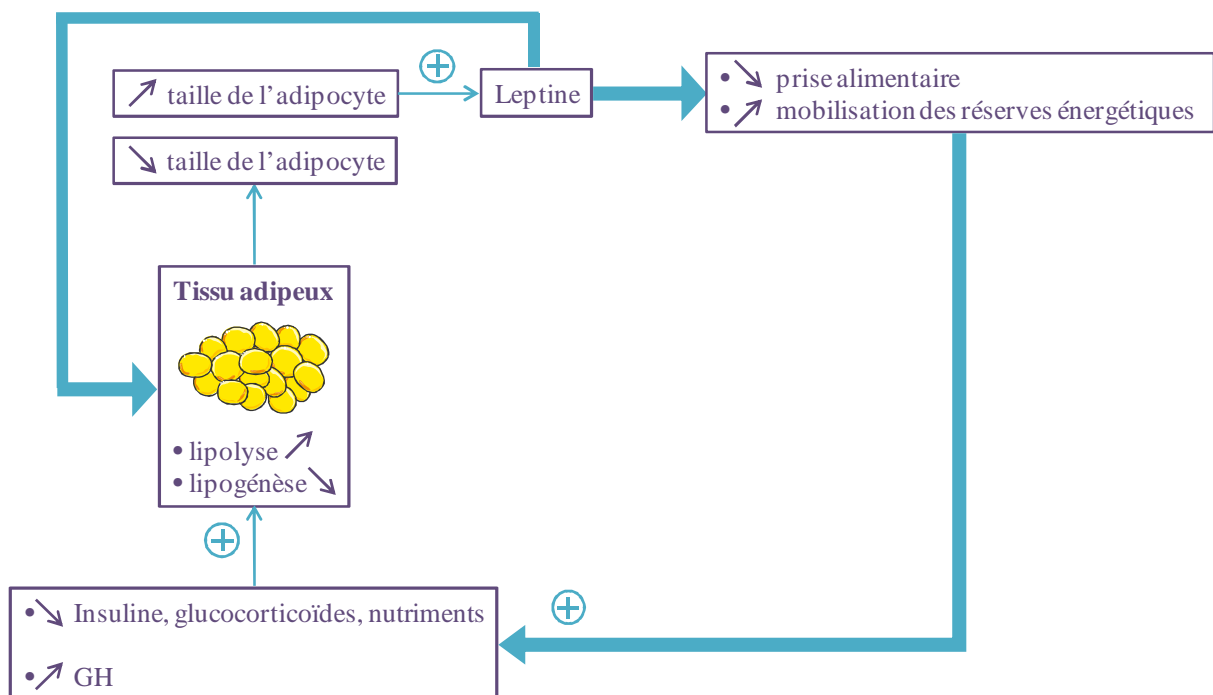


Figure 17 : Schéma du mode d'action de la leptine. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

En effet, l'augmentation du récepteur soluble Ob-Re diminue l'adiposité et donc le poids chez la souris (Ge *et al.*, 2002).

Lorsque la balance énergétique est stable, c'est à dire autant d'énergie ingérée que d'énergie dépensée, la leptine reflète la quantité de masse adipeuse. Lorsque la balance est perturbée, la leptine agit alors comme un capteur de ce déséquilibre énergétique (Sinha and Caro, 1998) (Figure 17). En effet, suite à un jeûne de 24 heures, on constate une diminution de 30 % de la concentration de leptine. Une suralimentation pendant 12h provoque une augmentation de 50 % de son taux basal. Cependant, cette variation ne serait pas due à la taille du repas, mais à la concentration d'insuline libérée dans le sang. Au niveau central, le signal leptine diminue la prise alimentaire et augmente la libération de réserves énergétiques.

Chez l'Homme, la leptine, comme la plupart des hormones, montre une variation circadienne avec un pic d'expression nocturne (Sinha and Caro, 1998). Ce pic serait dû à l'accumulation d'insuline au cours de la journée. Cette oscillation circadienne de l'expression de la leptine est conservée chez les patients obèses.

De plus, le cerveau des souris KO pour la leptine ou son récepteur Ob-Rb possèdent une organisation neuronale différente de celle des animaux contrôles. Des auteurs ont en effet, observé une réduction de la densité cellulaire, notamment au niveau de l'hypothalamus, une altération de l'orientation des cellules dendritiques ainsi qu'une diminution du poids du cerveau (Bereiter and Jeanrenaud, 1979 ; Bereiter and Jeanrenaud, 1980 ; Ahima *et al.*, 1999). Cependant, l'injection de leptine, chez les souris *ob/ob*, restaure le poids du cerveau (Steppan and Swick, 1999). La leptine pourrait donc avoir un rôle trophique dans le développement neuronal. *In vivo*, des injections de leptine chez le nouveau-né restaurent les altérations observées au niveau du NA en augmentant la densité et la longueur des axones (Bouret *et al.*, 2004). La leptine est donc un puissant agent neurotrophique qui influencerait la mise en place des connexions de l'hypothalamus. Le même type de traitement à la leptine chez l'adulte n'aura toutefois aucun effet sur les projections axonales du NA chez la souris *ob/ob* (Bouret *et al.*, 2004). Les effets de la leptine sur le développement des projections neuronales du NA auraient donc lieu uniquement durant une période restreinte de la vie postnatale précoce. Cette action serait à mettre en parallèle avec l'apparition d'un pic plasmatique de leptine chez le souriceau nouveau-né.

L'hypothalamus adulte n'est cependant pas insensible à l'action neuroplastique de la leptine. Il semblerait que le mode d'action et la sensibilité à la leptine soient différents chez le nouveau-né et l'adulte. En effet, comme nous venons de le voir, la leptine n'agit pas sur les projections axonales chez l'adulte, mais elle en modifierait l'organisation synaptique (Pinto *et al.*, 2004). Bien que son rôle ne soit pas encore clairement établi, l'expression du récepteur Ob-Rb dans les neurones du NA semble être un facteur clé du développement des circuits hypothalamiques induits par la leptine. En effet, le rat *fa/fa* déficient en récepteur Ob-Rb présente le même type d'altérations neuronales du NA que la souris *ob/ob* (Bouret and Simerly, 2007). Cependant, tous les noyaux de l'hypothalamus exprimant Ob-Rb ne sont pas sensibles à l'action neurotrophique de la leptine. Ainsi, les projections du NDM vers le NPV exprimant Ob-Rb ne sont pas perturbées chez la souris *ob/ob* (Bouret *et al.*, 2004).

d. L'insuline

L'insuline est une hormone hypoglycémisante produite par les cellules β du pancréas. Elle assure le maintien d'une glycémie à 1g.L^{-1} . Elle est le premier signal d'adiposité décrit. Le taux d'insuline varie en fonction de l'adiposité de l'individu (Bagdade *et al.*, 1967). En cas de balance énergétique positive, c'est à dire quand la prise alimentaire est supérieure à l'énergie dépensée, on constate une augmentation du taux d'insuline et inversement (Woods *et al.*, 1974). Son administration centrale de manière chronique diminue la prise alimentaire (Woods *et al.*, 1979). Contrairement à la leptine, l'insuline est rapidement libérée et sa concentration est maximale les premières minutes qui suivent l'ingestion du repas (Polonsky *et al.*, 1988). Elle traverse la barrière hémato-encéphalique et atteint le cerveau où elle exerce un rôle anorexigène. Il se pourrait que l'insuline soit également produite par le cerveau (Banks, 2004), mais cette hypothèse reste controversée. Le récepteur à l'insuline est exprimé dans la quasi-totalité des tissus des mammifères. Au niveau périphérique, les tissus qui l'expriment le plus sont le tissu adipeux, le foie et les muscles. L'insuline y facilite l'entrée et donc l'utilisation du glucose par les cellules *via* le transporteur au glucose GLUT4 (Chang *et al.*, 2004). Au niveau central, on retrouve son récepteur exprimé plus particulièrement au niveau du NA. L'injection ICV d'insuline en période de jeûne empêche l'augmentation du NPY normalement induit dans ces conditions, et augmente l'expression de la POMC. L'insuline inhibe donc le système orexigène à NPY (Schwartz *et al.*, 1992) et stimule la voie

anorexigène de la POMC (Air *et al.*, 2002) pour diminuer la prise alimentaire et la prise de poids chez un individu sain (Stockhorst *et al.*, 2004). La diminution de l'expression du récepteur à l'insuline dans le NA induit une hyperphagie et une augmentation de la masse adipeuse chez la souris (Obici *et al.*, 2002a). Les souris KO pour ce récepteur souffrent de dysfonctionnements métaboliques létaux. L'ensemble de ces résultats montrent l'importance du rôle de l'insuline dans le maintien de l'homéostasie énergétique.

e. L'adiponectine

L'adiponectine est produite par les adipocytes de façon inversement proportionnelle à la masse de TA. Elle se fixe sur ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 couplés aux protéines G (Yamauchi *et al.*, 2003). Ces récepteurs sont présents au niveau du NA, mais également au niveau du foie et des muscles squelettiques. Une étude récente a montré que l'adiponectine agit également au niveau du noyau arqué pour augmenter la prise alimentaire et diminuer la dépense énergétique. Contrairement aux autres adipokines, la diminution de l'adiponectine est associée à une résistance à l'insuline, prémices d'un diabète de type 2 (Kadowaki *et al.*, 2008). L'adiponectine semble donc être un important modulateur de la masse de tissu adipeux et de la balance énergétique. Son action sur la régulation de la glycémie se fait en 2 temps : elle stimule l'entrée du glucose dans l'adipocyte (Wu *et al.*, 2003) et inhibe la production hépatique de glucose (Combs *et al.*, 2001). En cas de diminution de la masse de tissu adipeux, le signal de l'adiponectine augmente au niveau du noyau arqué tandis que celui de la leptine diminue. Il en résulte une diminution de la dépense énergétique et une augmentation du stockage des réserves graisseuses. Les réponses hormonales et physiologiques sont inversées dans le cas d'un excès de dépôt graisseux.

f. La bombésine

La bombésine est un peptide de 14 acides aminés, isolé chez l'amphibien. Ces récepteurs sont exprimés dans l'hypothalamus et le tractus gastro-intestinal (Wada *et al.*, 1991). L'expression de la bombésine est induite par la distension gastrique. Il se pourrait donc

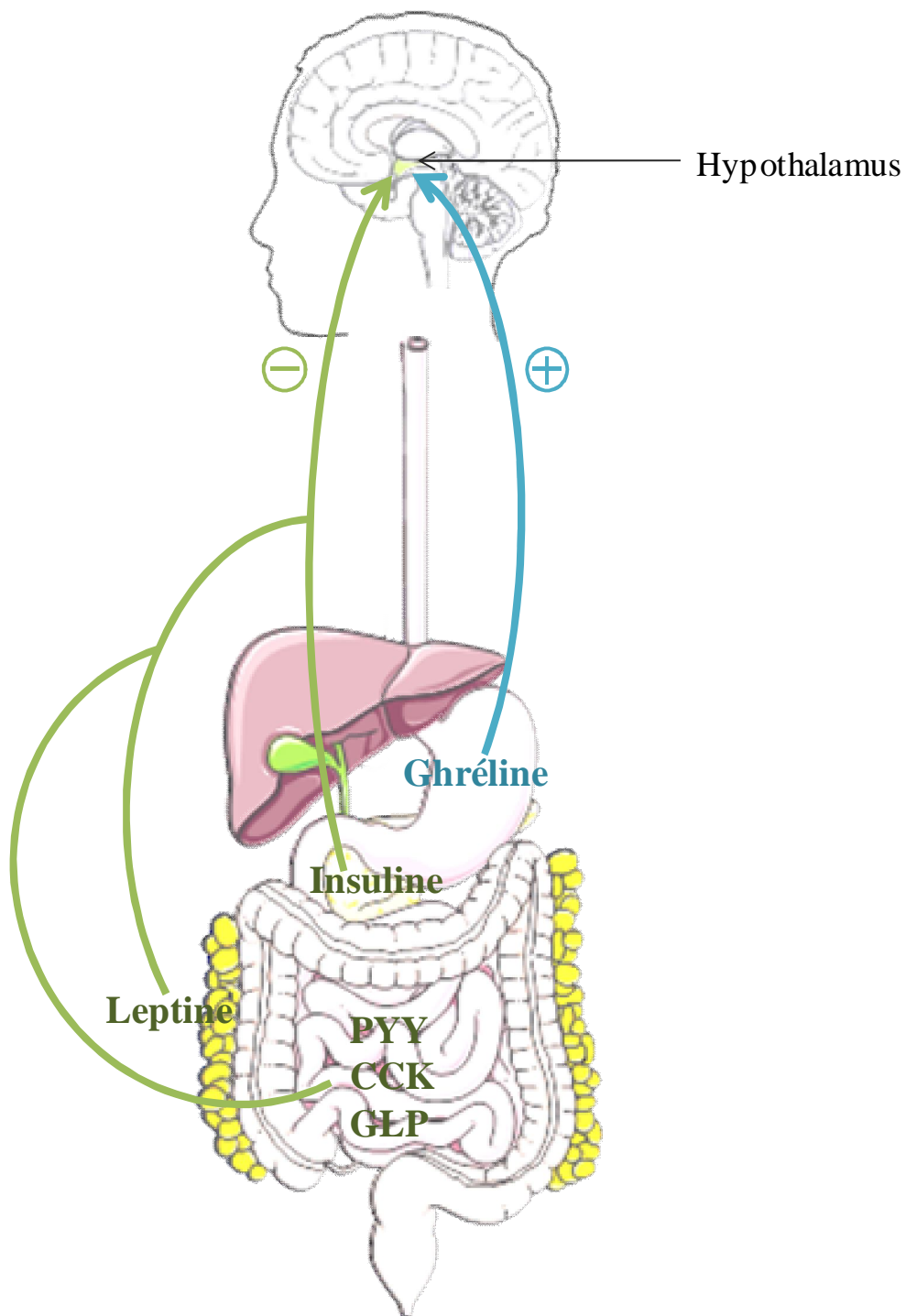


Figure 18 : Représentation schématique de la régulation périphérique de la prise alimentaire. Flèche bleue : stimulation ; flèche verte : inhibition. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

qu'elle informe les centres régulateurs centraux de la prise alimentaire, de la sensation de satiété du sujet (Rampal, 1986). En effet, son administration centrale supprime la prise alimentaire (Merali *et al.*, 1993). L'équivalent de la bombésine chez les mammifères est le *Gastrin Releasing Peptide* (GRP).

g. Les glucagon-like peptides

Le gène du préproglucagon est exprimé uniquement dans les cellules α du pancréas, les cellules L de l'intestin et dans le noyau du tractus solitaire du TC. Dans le pancréas, il est clivé en glucagon, tandis que dans le NTS et l'intestin, il produit la glicentine, l'oxyntomoduline, le *Glucagon-Like Peptide 1* (GLP1) et le GLP2. GLP1 et 2 sont colocalisés en forte concentration au niveau du NDM. Une injection ICV de GLP1 directement dans le NPV induit l'anorexie chez le rat (Kinzig *et al.*, 2002). De la même façon, une injection ICV de GLP2 dans le NDM inhibe la prise alimentaire (Tang-Christensen *et al.*, 2001). L'exendine, antagoniste du récepteur GLP1, stimule la prise alimentaire chez le rat déjà nourri. Son administration chronique augmente la prise alimentaire et la prise de poids. Il semblerait que cet antagoniste stimule la voie du NPY et augmente l'apport calorique (Kalra *et al.*, 1999). GLP1 et 2 sont donc impliqués dans la régulation de la prise alimentaire mais interviennent également dans de nombreux mécanismes de régulation telles que l'homéostasie glucidique et la sécrétion d'insuline (Tang-Christensen *et al.*, 2001).

Le système nerveux central, et plus particulièrement l'hypothalamus, est donc en relation directe avec les organes périphérique (Figure 18). Cette périphérie est à la fois capable d'intégrer des signaux physiologiques lui permettant d'évaluer l'état énergétique de l'individu mais également d'en informer la partie centrale. La prise alimentaire est donc régulée de manière très fine *via* ces afférences périphériques, qui ont des actions à plus ou moins long terme et l'action de neuropeptides orexigènes et anorexigènes centraux. Une perturbation, si fine soit elle, d'un de ces paramètres pourrait déséquilibrer la balance énergétique. Ce déséquilibre peut conduire l'individu vers un phénotype d'obésité, qui pourrait être le premier pas vers la mise en place d'un syndrome métabolique.

L'homéostasie énergétique est en partie fonction de la dépense énergétique résultant elle-même de l'équilibre entre le stockage des réserves et leur consommation par l'organisme. Le tissu adipeux est un des principaux acteurs impliqués dans cette régulation.

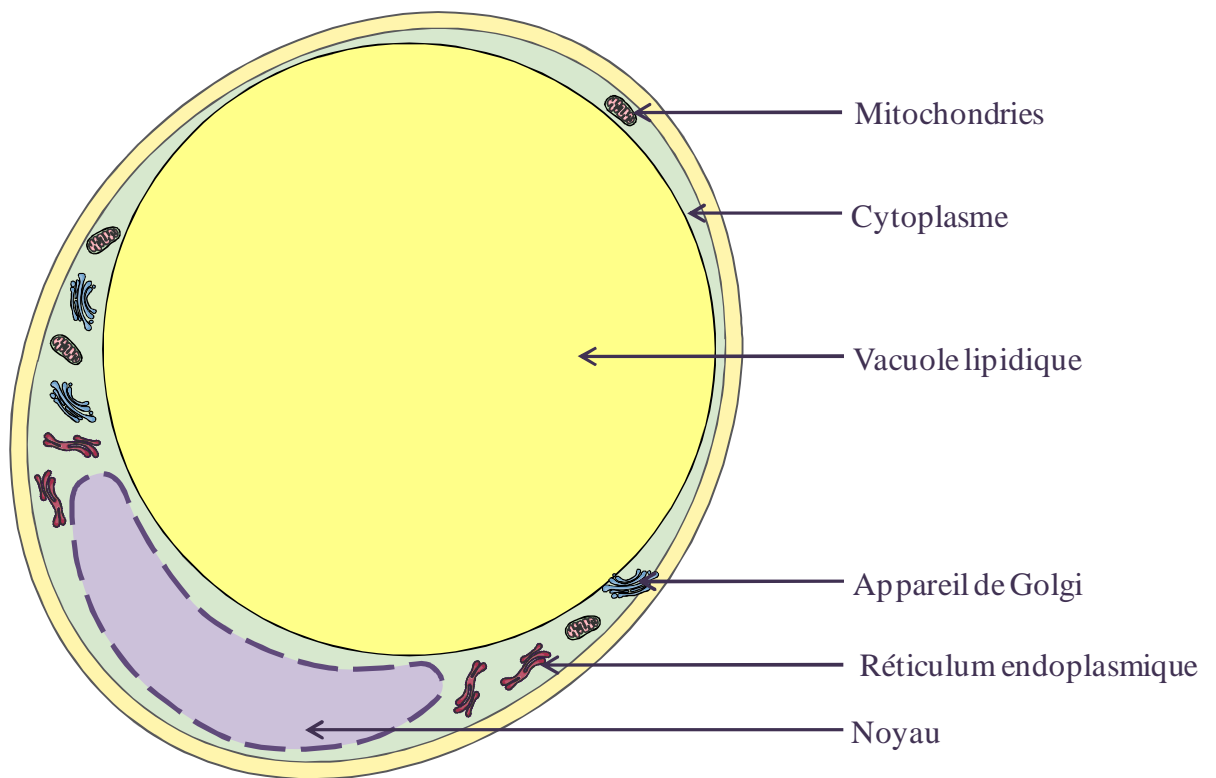


Figure 19 : Représentation schématique d'une adipocyte blanc. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

IV. Le tissu adipeux : un tissu endocrinien

Le tissu adipeux est un acteur prédominant dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Chez les mammifères, on trouve deux sortes de tissus adipeux (TA) : le TA blanc et le TA brun (TAB) (Cinti, 1999). Le TA blanc constitue la plus grande réserve énergétique de l'organisme. Le TAB quant à lui joue un rôle important dans la thermogénèse.

A. Généralités

Le TA blanc est composé d'adipocytes contenant une large vacuole lipidique unique pouvant représenter jusqu'à 95 % du volume cellulaire total. Cette vacuole est entourée par une mince couronne cytoplasmique. L'adipocyte possède assez peu de mitochondries et d'organites, son noyau est aplati et refoulé en périphérie (Figure 19). L'adipocyte est donc rempli de lipides. Son diamètre peut atteindre 100 µm ou plus, on parle dans ce cas d'hypertrophie adipocytaire. L'augmentation de la masse du TA peut également provenir d'une augmentation du nombre d'adipocytes appelée hyperplasie. Dans le TA blanc, les adipocytes, tassés les uns contre les autres, prennent une forme polyédrique. Ils sont séparés par des fibres de réticuline et de très nombreux capillaires sanguins ainsi que par des fibres sympathiques noradrénergiques. Les adipocytes sont groupés en petits lobules séparés par de fines cloisons conjonctives contenant des fibroblastes, des macrophages, des mastocytes et des fibrilles de collagène.

Le tissu adipeux a longtemps été considéré comme un tissu inerte servant de protection mécanique, d'isolement thermique, de stockage de lipides sous la forme de triglycérides (TG) et de mobilisation des acides gras mis en réserve. Cette vision a évolué avec la découverte de la riche activité de sécrétion des adipocytes et l'accumulation de cellules immunitaires telles que des macrophages ou des lymphocytes au sein du TA de patients obèses. C'est un tissu extrêmement plastique dont le poids évolue en fonction de l'équilibre de la balance énergétique : il s'hypertrophie en réponse à un régime hypercalorique en accumulant des triglycérides et inversement. Cette hypertrophie se caractérise par l'hypertrophie des adipocytes existant, puis par l'hyperplasie des cellules souches du TA en cas d'obésité morbide (Géloën *et al.*, 1989).

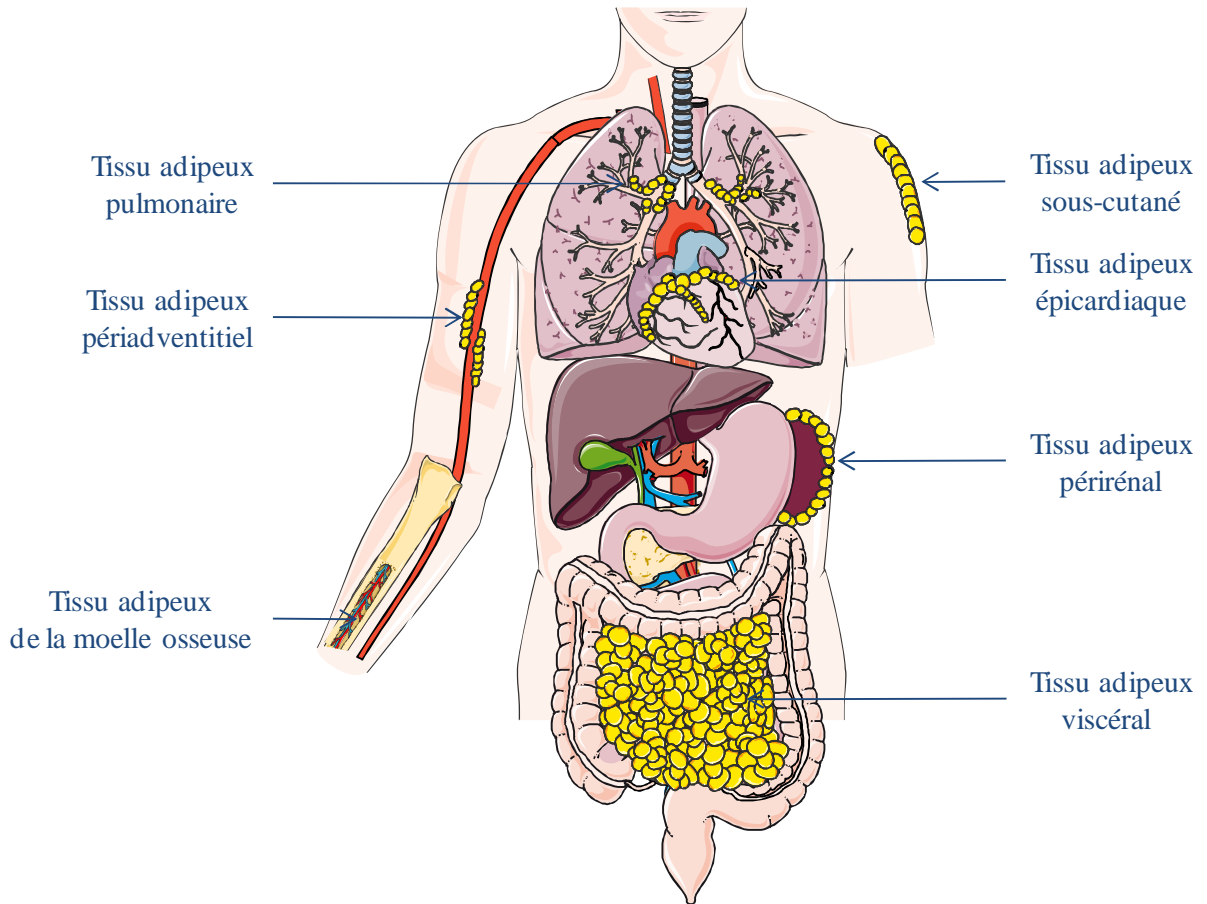


Figure 20 : Représentation schématique de la répartition des différents dépôts adipeux de l'organisme. D'après Ouchi (2011). Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

Le TA est le principal tissu de réserve de l'organisme puisqu'il représente à lui seul plus de 75 % des réserves énergétiques, soit 10 à 15 kg chez un jeune individu adulte de poids moyen. Le TA se retrouve dans plusieurs zones de l'organisme qui semblent être les mêmes entre les espèces (Figure 20). Les dépôts adipeux sont classés en trois catégories qui sont localisées au niveau :

- des orbites, des paumes et faces palmaires des doigts, des plantes et faces plantaires des orteils. Ce TA joue un rôle de soutien, de protection mécanique. Il est peu sensible au jeûne.
- du pannicule adipeux sous-cutané. Le TA sous-cutané est composé d'un dépôt de TA superficiel et d'un dépôt plus profond (Shen *et al.*, 2003). Il est diffus et régulier chez le fœtus et le nouveau-né. Chez l'homme, il est prédominant sur la nuque et les épaules, la poitrine, les hanches, les cuisses et les fesses chez la femme.
- les régions profondes, comme le mésentère et les régions rétro-péritonéales. Le TA profond regroupe le TA viscéral, non viscéral, intra et périmusculaire (Shen *et al.*, 2003).

Les TA sous cutanés et profonds correspondent aux réserves énergétiques dont le volume varie en fonction de l'apport calorique. Il semblerait que ces TA aient un profil sécrétoire différent (Fain *et al.*, 2004). En effet, le TA viscéral présente une plus forte expression de cytokines pro-inflammatoires, comme le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α), que le sous-cutané. En effet, au cours du développement de l'obésité, l'infiltration macrophagique semble être plus importante dans le TA profond que dans le sous-cutané (Harman-Boehm *et al.*, 2007). Les dépôts adipeux présenteraient donc des caractéristiques métaboliques distinctes en fonction de leur localisation.

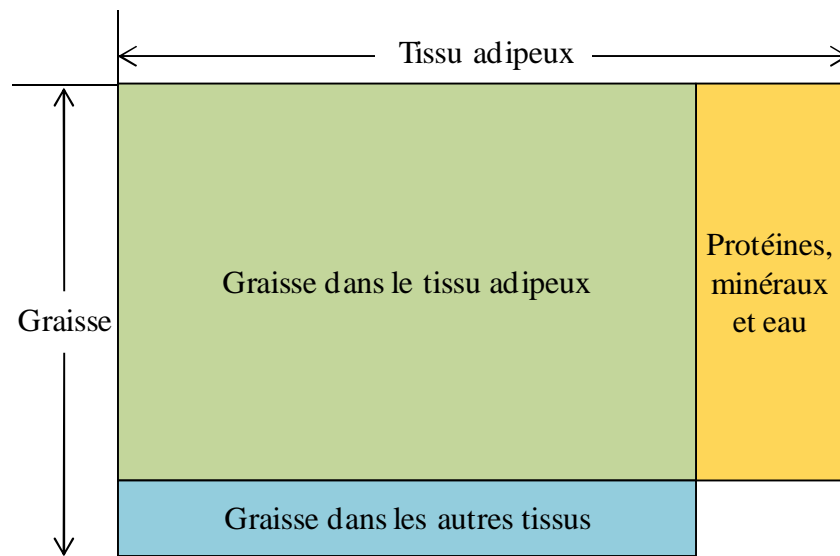


Figure 21 : Représentation de la composition du tissu adipeux. D'après Shen *et al.*, (2003)

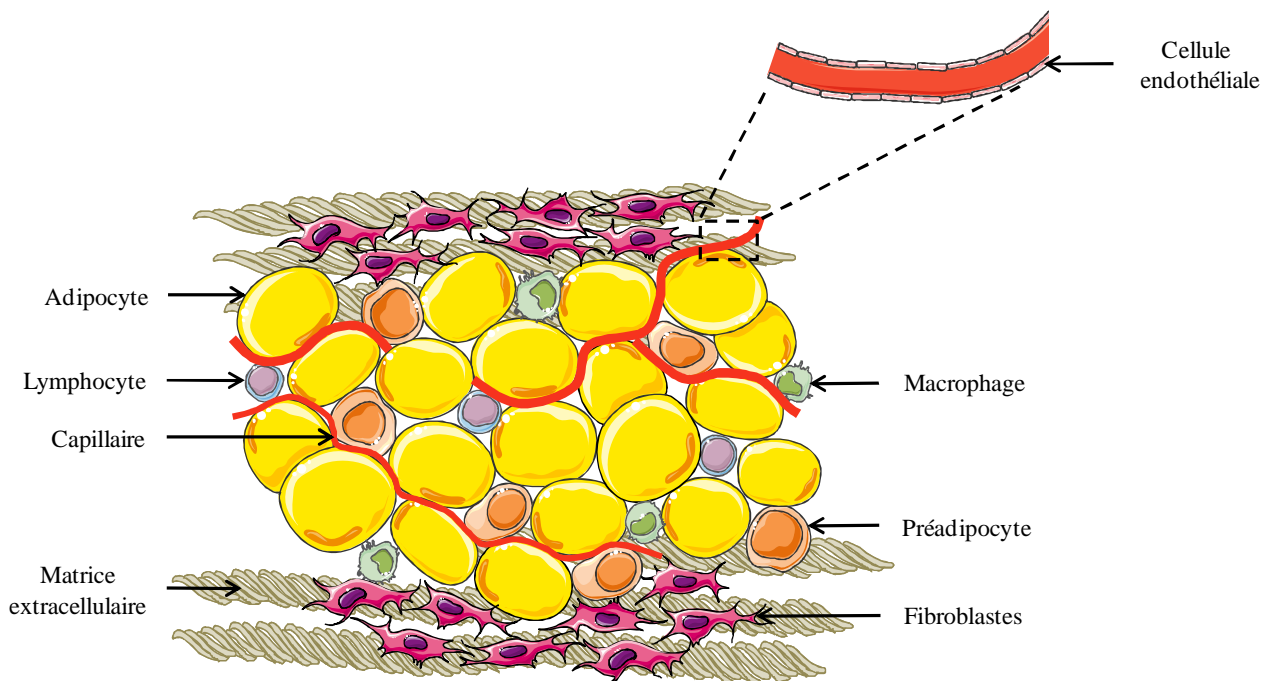


Figure 22 : Schéma de la diversité cellulaire du tissu adipeux. D'après Shen *et al.*, (2003).
Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

B. Les différents types cellulaires du tissu adipeux blanc

Le TA n'est pas qu'un simple amas graisseux (Figure 21). Contrairement au TA, qui est un tissu complexe, la graisse est uniquement composée de lipides sous formes de triglycérides. Bien qu'elle soit surtout retrouvée dans le TA, la graisse peut être présente dans d'autres tissus, notamment dans des pathologies du type de la stéatose hépatique. Le TA est quant à lui composé d'environ 80 % de graisse, les 20 % restant étant un mélange d'eau, de protéines et de minéraux

Le TA blanc présente une grande hétérogénéité cellulaire. On peut classer les cellules le composant en deux grandes populations : les adipocytes matures et la fraction stroma-vasculaire (FSV) (Rodbell, 1964). L'adipocyte est le type cellulaire majoritaire comme nous avons pu le voir précédemment. On distingue quatre groupes cellulaires parmi les cellules de la FSV : les préadipocytes, les cellules endothéliales, les cellules d'origine hématopoïétiques et les cellules progénitrices (Figure 22).

Le préadipocyte est relativement immature. Il peut proliférer et se différencier en adipocyte mature, en fonction des besoins de la balance énergétique. Il peut être recruté tout au long de la vie adulte (Ron *et al.*, 1992). Les préadipocytes ont un phénotype très proche de celui des macrophages. Ils sécrètent en effet, de nombreuses cytokines inflammatoires tel que le TNF α (Lin *et al.*, 2000). Des expériences *in vitro* et *in vivo* de mise en contact avec des macrophages, montrent une différenciation du préadipocyte en macrophage (Charrière *et al.*, 2003).

Le TA possède un réseau capillaire semblable à celui du muscle squelettique (Hausberger and Widelitz, 1963). Les cellules endothéliales permettent le développement du TA en participant à sa néovascularisation. Leur nombre augmente avec la prise de poids.

Les cellules d'origine hématopoïétique regroupent deux populations : les lymphocytes et les macrophages. Le TA semble jouer un rôle important dans la régulation du processus inflammatoire, non seulement en tant que réserve énergétique mais également en tant qu'important organe endocrinien. L'obésité est caractérisée par un état d'inflammation (Mendall *et al.*, 1997), résultant surtout de l'augmentation de la taille, voire du nombre, des adipocytes et de leur activité macrophage. Le rôle des lymphocytes du TA n'est pas encore déterminé. Il existe deux familles de macrophages impliqués dans le développement de

l'obésité chez la souris : les pro-inflammatoires et les anti-inflammatoires. Les pro-inflammatoires pourraient jouer un rôle dans la mise en place de la résistance à l'insuline associée. En effet, la suppression de l'expression du TNF α chez le rat *fa/fa*, déficient en récepteurs Ob-Rb, augmente significativement la recapture du glucose en réponse à l'insuline (Hotamisligil *et al.*, 1993). Le TNF α serait en partie responsable de la résistance à l'insuline et donc du diabète de type II induit par l'obésité. Les protéines anti-inflammatoires tel que le PPAR γ , auraient quant à eux un rôle bénéfique. PPAR γ semble en effet, intervenir dans le maintien de la sensibilité à l'insuline (Odegaard *et al.*, 2007).

Les cellules progénitrices ou cellules souches du TA peuvent être à l'origine de différentes lignées cellulaires. *In vitro*, elles peuvent se différencier en adipocytes, en cellules semblables aux cellules endothéliales ou encore sécréter des facteurs angiogènes qui pourraient être impliqués dans la néovascularisation du TA (Sengenès *et al.*, 2007). *In vivo*, elles favorisent la revascularisation lorsqu'elles sont injectées dans un muscle en condition d'ischémie (Miranville *et al.*, 2004) et se dirigent spontanément vers un phénotype d'adipocyte en contact de TA de patient obèse (Maumus *et al.*, 2011). Bien que leur rôle thérapeutique soit prometteur, leur rôle au sein du TA reste à déterminer.

Le TA est essentiellement innervé par des fibres orthosympathiques. Le signal nerveux est transmis au TA par la noradrénaline qui stimule la mobilisation des lipides, phénomène de lipolyse, et inhibe la prolifération des cellules du TA (Bowers *et al.*, 2004). Le TA est donc un tissu extrêmement hétérogène. Bien que la caractérisation des cellules qui le composent soit toujours en cours, leur présence module le développement et la physiologie du TA.

C. La tissu adipeux blanc : lieu de synthèse et stockage des lipides

1. La lipogenèse

Le TA renferme la très grande majorité des triglycérides du corps et constitue la principale réserve d'énergie de l'organisme. La synthèse des lipides, appelée lipogenèse, est stimulée par l'insuline. Ce processus se fait à partir du glucose. Les deux sites majeurs de la synthèse *de novo* des acides gras (AG) sont le foie et le TA chez l'Homme et uniquement le

TA chez le rat. Cette synthèse est régulée par deux enzymes clés : l'Acetyl Coenzyme A carboxylase (ACC) et la *Fatty Acid Synthase* (FAS). C'est en effet, sous l'action de ces deux enzymes que le glucose est transformé en AG. La leptine inhibe *in vitro* l'expression de l'ACC et par conséquent la synthèse des acides gras et des lipides dans le TA sans intervention des signaux centraux (Bai *et al.*, 1996). La leptine inhibe donc la lipogenèse et réduit significativement la taille de la vacuole lipidique.

La lipogenèse est donc cruciale dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Pour maintenir l'équilibre de la balance énergétique, ce phénomène de stockage nécessite une libération des réserves. La lipogenèse évolue donc en étroite collaboration avec la lipolyse.

2. La lipolyse

Lors de la lipolyse, les triglycérides (TG) sont hydrolysés en AG libres et glycérol. Ces molécules fourniront alors l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des organes périphériques. Elle est stimulée par les catécholamines, essentiellement *via* le récepteur $\beta 3$ adrénergique dans le TA chez le rat. La stimulation de ce récepteur active la lipase hormono-sensible (LHS), enzyme clé de la lipolyse. La lipolyse est inhibée par l'insuline.

D. L'adipogenèse

1. La différenciation du préadipocyte

L'adipogenèse semble se dérouler en deux temps :

- lors de la première phase, appelée détermination de la lignée, il y a conversion de cellules souches pluripotentes en préadipocytes. *In vivo*, on note l'absence de marqueurs immunologiques en surface de ces cellules. Le préadipocyte ne se différencie alors de la cellule souche que par son incapacité à évoluer vers un autre type cellulaire que l'adipocyte.

- la deuxième phase est la différenciation terminale en adipocyte. Le préadipocyte évolue vers un phénotype d'adipocyte mature et acquiert alors les fonctions de lipolyse, lipogenèse, et la sensibilité à l'insuline.

L'adipogenèse est essentielle au maintien de l'homéostasie énergétique. Le déficit ou la surabondance de TA entraîne de profondes altérations métaboliques qui peuvent conduire à un état pathologique. L'adipogenèse est régulée par de nombreux facteurs de transcription tels que les *CCAAT/Enhancer Binding Proteins* (C/EBPs), PPARs et les *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP) (Koutnikova and Auwerx, 2001). De nombreux membres de la famille des C/EBPs sont exprimés par l'adipocyte tels que le C/EBP α , C/EBP β et C/EBP δ . C/EBP β et C/EBP δ , exprimés par le préadipocyte, induisent l'expression de C/EBP α . Ces facteurs de transcription vont alors activer l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la régulation de la balance énergétique comme la leptine ou l'adiponectine, ou régulant la sensibilité à l'insuline (Rosen, 2005). Ils activent également l'expression des PPARs. La famille PPAR compte plusieurs sous types : PPAR α , PPAR γ et PPAR δ , un facteur essentiel de l'adipogenèse. En effet, en l'absence de PPAR δ , l'adipogenèse semble impossible. PPAR γ semble enclencher les préadipocytes vers un phénotype de lignée adipocytaire (Tontonoz *et al.*, 1994). C/EBP α travaillerait de concert avec PPAR γ dans cette différenciation des adipocytes. PPAR γ induit l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique notamment l'Acétyl-coA Carboxylase (ACC).

Ces mécanismes de régulation de l'adipogenèse sont également modulés en aval par de nombreux facteurs capables de l'activer ou de l'inhiber.

2. Les facteurs pro-adipogènes

Il existe également de nombreux facteurs favorisant l'adipogenèse. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'insuline, la leptine et aux glucocorticoïdes dans ce paragraphe. *In vitro*, l'insuline induit l'adipogenèse *via* l'augmentation de l'expression des ARNm de l'ACC et de FAS (Girard *et al.*, 1994). Une mutation *in vivo* d'un ou plusieurs des ces isoformes inhibe l'adipogenèse (Laustsen *et al.*, 2002). Il semblerait que cette altération soit plus ou moins marquée en fonction des récepteurs touchés.

Les glucocorticoïdes sont d'importants stimulateurs de l'adipogenèse. En effet, la dexaméthasone (DEX), un analogue synthétique des glucocorticoïdes, favorise *in vitro* la différenciation des adipocytes (Shi *et al.*, 2000). Ce mécanisme se déroulerait *via* le recrutement de PPAR γ . L'excès de glucocorticoïdes est à l'origine d'une obésité viscérale. Cependant, le taux de glucocorticoïdes est normal chez un individu obèse. La surexpression de la 11 β -HSD1 au niveau du TA, entraîne l'apparition d'une obésité viscérale chez la souris (Masuzaki *et al.*, 2001), tandis que la surexpression de la 11 β -HSD2 au niveau du TA, protège la souris du développement de l'obésité sous régime hyperlipidique (Kershaw *et al.*, 2005).

3. Les facteurs anti-adipogènes

De nombreuses molécules ont démontré leurs effets anti-adipogéniques *in vitro* tels que des cytokines inflammatoires comme le TNF α . Leur mode d'action est sensiblement le même et tend à réprimer l'expression de PPAR γ et de C/EBP α . Nous ne détaillerons que l'un des ces principaux facteurs : le *Preadipocyte factor 1* (Pref-1). Cette glycoprotéine est abondamment présente à la surface des préadipocytes, diminue lors de leur différenciation et est totalement absente des adipocytes. La surexpression *in vitro* de l'expression de Pref-1 inhibe la différenciation du préadipocyte (Smas and Sul, 1993). La surexpression *in vivo* de Pref-1 induit une diminution de la taille de adipocytes et donc de la taille du TA, mais également une tolérance au glucose accompagnée d'une diminution de la sensibilité à l'insuline (Lee *et al.*, 2003). Pref-1 inhibe donc l'adipogenèse en bloquant la différenciation adipocytaire. Cet effet modifie la fonction de l'adipocyte et provoque l'apparition d'altérations du métabolisme. L'expression de Pref-1 est inhibée par les glucocorticoïdes (Smas *et al.*, 1999).

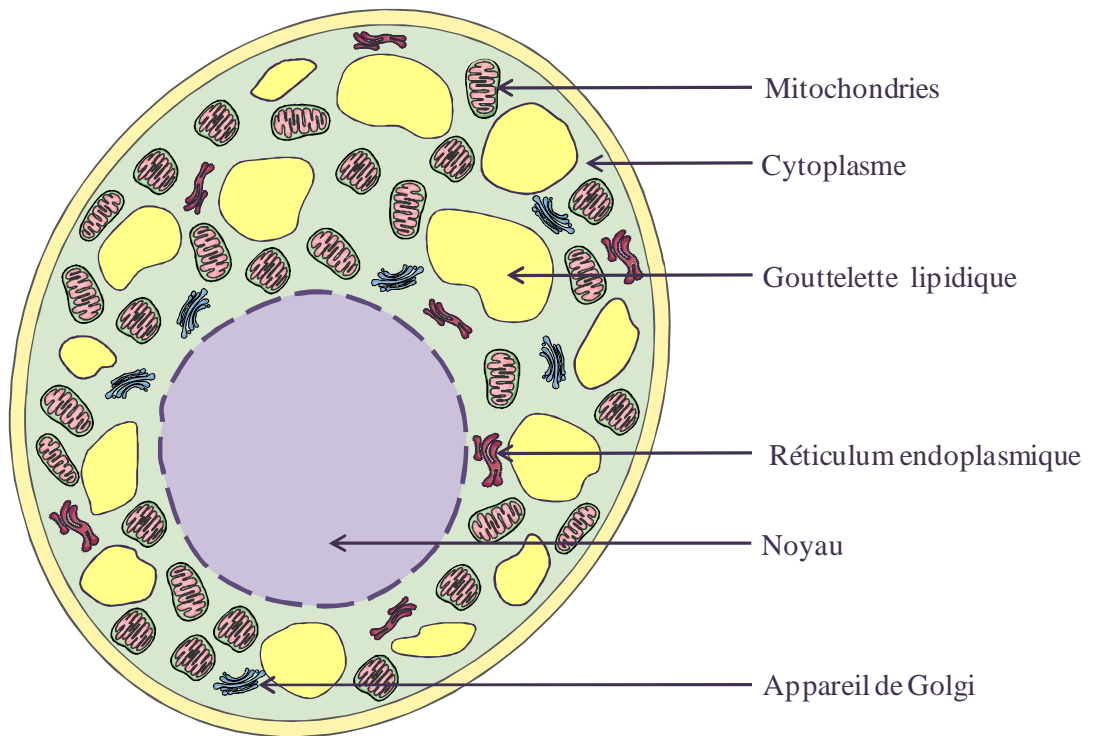


Figure 23 : Représentation schématique d'un adipocyte brun. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art

E. Le tissu adipeux brun

Le TAB est présent chez les mammifères hibernants, ce qui assure le réchauffement de l'organisme pendant la période de sommeil, et chez les rongeurs. Chez l'Homme et la plupart des mammifères, il a tendance à s'atrophier dès la naissance pour ne laisser qu'un dépôt résiduel. Son rôle thermogénique chez l'adulte reste cependant controversé (Nedergaard *et al.*, 2007). Le TAB est différent du TA blanc. Ces adipocytes contiennent en effet, plusieurs gouttelettes lipidiques, on dit qu'ils sont multiloculaires. La coloration du tissu adipeux brun (TAB) provient du grand nombre de mitochondries qu'il contient (Figure 23). C'est grâce à la présence de l'*Uncoupling protein 1* (UCP1), une protéine découplante de la chaîne respiratoire des mitochondries, qu'il participe à la thermogénèse sans frisson en oxydant les acides gras sans production d'ATP. Le TAB est sous contrôle du système nerveux sympathique. Lors d'une exposition prolongée au froid, la noradréline libérée augmente le nombre de mitochondries et donc l'expression d'UCP1. (Mory *et al.*, 1984).

V. Programmation de l'axe hypothalamo-adipocytaire durant la période périnatale

L'hypothalamus et le TA sont des organes clés du métabolisme énergétique. Les adipokines, notamment la leptine, permettent la mise en place d'un dialogue entre ces deux protagonistes. Cette connexion entre l'hypothalamus et le TA est appelée axe hypothalamo-adipocytaire, et est en partie impliquée dans le contrôle de l'équilibre de l'homéostasie énergétique. Comme nous avons pu le voir, des altérations du signal induit par la leptine sont à l'origine d'un phénotype d'obésité. Cependant, la leptine est également impliquée dans le développement des circuits neuronaux de l'hypothalamus et la mise en place du TA (Chen *et al.*, 2000). Le développement postnatal précoce est donc une période essentielle à la mise en place de l'axe hypothalamo-adipocytaire. En cas de perturbations durant cette période, le développement ainsi que le dialogue de cet axe peuvent être altérés. Il en résulte alors des troubles du métabolisme énergétique à l'origine de l'apparition de traits du syndrome métabolique tels que l'obésité ou le diabète.

A. Les modifications de l'environnement nutritionnel périnatal

1. La dénutrition périnatale

Chez le rat, la quantité de lait ingérée pendant la lactation joue un rôle clé dans le comportement alimentaire à l'âge adulte (Oscai and McGarr, 1978). C'est plus précisément la concentration de leptine durant la gestation et la lactation qui affecterait le développement de mécanismes impliqués dans la régulation de la balance énergétique de la descendance (Cripps *et al.*, 2009). Chez la souris, la leptine augmente de manière transitoire durant la période postnatale décrivant alors un pic de concentration au 10^{ème} jour postnatal (Ahima *et al.*, 1998). Comme nous avons pu le voir, la leptine diminue la prise alimentaire chez l'adulte en stimulant les neurones anorexigènes de l'hypothalamus et en inhibant les neurones orexigènes. Chez le raton en cours de développement, bien que le TA soit peu abondant, le taux circulant de leptine est élevé, mais ne semble pas agir sur la prise alimentaire bien que

ses effets sur les neurones à POMC et NPY soient similaires à ceux observés chez l'adulte (Proulx *et al.*, 2002). La leptine a cependant des effets neurotrophiques durant cette période néonatale (Bouret *et al.*, 2004). Le pic de leptine interviendrait donc dans la formation des circuits neuronaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique. En effet, une dénutrition maternelle (DM) de 50 % durant la gestation et la lactation, diminue très fortement le pic de leptine postnatal chez le rat, ainsi que l'expression de la POMC dans l'hypothalamus (Delahaye *et al.*, 2008). Une DM de 70 % à partir du 10^{ème} jour de gestation jusqu'à la parturition, avance quant à elle l'apparition du pic de leptine durant la lactation chez la descendance. Ce décalage serait à l'origine de l'hyperphagie conduisant à l'obésité de la descendance à l'âge adulte (Yura *et al.*, 2005). Ce phénomène est toutefois réversible puisque l'administration postnatale de leptine aux nouveau-nés issus de mères dénutries, empêche le développement de l'hyperphagie et de l'obésité (Vickers *et al.*, 2008).

Bien que le lien entre l'apparition du phénotype d'obésité chez l'adulte et la malnutrition maternelle ne soit pas encore clairement établi, des études ont démontré que la DM associée à un régime alimentaire postnatal normal ou riche en lipides, augmente la prévalence de l'obésité chez l'adulte. Ainsi l'adoption par les femelles nourries *ad libitum* de nouveau-nés ayant subi une DM de 50 % pendant la gestation, induit un rattrapage de croissance rapide, également appelé « *catch-up* », associée à une masse adipeuse plus importante (Desai *et al.*, 2005). Le développement du TA dépend également du stade de la gestation durant lequel est appliquée la DM. Lorsque les femelles sont dénutries à 50 % durant les deux premières semaines de gestation, la descendance mâle développe une hyperphagie à l'origine d'une obésité quand les animaux sont soumis à un régime HF (Jones *et al.*, 1986). L'obésité chez ces animaux est caractérisée par une hypertrophie des adipocytes du TA épидидymal. Dans ce type de modèle, c'est le retour à un régime standard la 3^{ème} semaine de gestation qui semble être déterminant dans l'apparition de l'obésité chez l'adulte (Stephens, 1980). Une DM de 50 % à partir du 10^{ème} jour de gestation jusqu'à la parturition programme quant à elle une augmentation de l'expression de facteurs impliqués dans l'adipogenèse tels que le PPAR γ ou SREBP1c (Desai *et al.*, 2008). De plus, dans un modèle de DM de 50 %, le « *catch-up* » augmente le niveau d'expression de gènes impliqués dans lipogenèse du TA, résultant en une augmentation du diamètre des adipocytes (Isganaitis *et al.*, 2009). Il semblerait donc que l'augmentation du TA observée lors d'un « *catch-up* » soit une conséquence de la lipogenèse plutôt que de l'adipogenèse dans les modèles murins.

Les rats ayant subi une DM sévère de 70 % tout au long de la gestation suivie d'une adoption par des femelles sous régime standard, présente un RCIU et conserve une masse pondérale inférieure tout au long de la vie postnatale malgré une augmentation de la prise alimentaire et de la masse de TA rétropéritonéal (Vickers *et al.*, 2000). L'hyperinsulinémie et l'hyperleptinémie observées chez ces animaux semblent être des perturbations critiques qui entraînent le développement de l'hyperphagie, de l'obésité et de l'hypertension. L'amplification des altérations métaboliques observées chez la descendance par un régime HF, suggère que l'environnement postnatal est un important catalyseur de l'étiologie du SM (Vickers *et al.*, 2000). Une diminution de l'activité locomotrice a également été observée chez ces animaux avant le développement de l'obésité (Vickers *et al.*, 2003).

Un traitement néonatal à la leptine entre le 3^{ème} et le 13^{ème} jour de vie postnatale reverse les séquelles postnatales induites par la programmation fœtale chez la femelle (Vickers *et al.*, 2005). Cette étude montre l'effet réversible de la programmation fœtale durant la période de plasticité développementale. Les effets bénéfiques observés pourraient être, en partie, dus à la restauration d'éventuelles perturbations structurales au niveau de l'hypothalamus. Chez le mâle, ce traitement prévient l'apparition de l'obésité à l'âge adulte, uniquement lorsque les animaux reçoivent un régime standard après le sevrage (Vickers *et al.*, 2008).

La dénutrition à l'origine d'un appauvrissement de l'environnement en nutriments, peut également avoir lieu durant le développement postnatal précoce. Le modèle le plus répandu consiste en une réduction de la disponibilité du lait maternel en augmentant le nombre de petits par portée. Les animaux obtenus présentent un retard de croissance précoce, une masse pondérale inférieure à celle des animaux témoins et ce tout au long de leur vie, ainsi qu'une résistance à la leptine et une intolérance au glucose (Codo and Carlini, 1979). La surnutrition postnatale augmente cependant la prise alimentaire chez l'adulte (Plagemann *et al.*, 2009).

De nombreuses études ont également montré que la malnutrition tout comme la DM peuvent induire une hypertension chez la descendance mâle à l'âge adulte. Dans un modèle de dénutrition maternelle à 70 %, la progéniture présente une hypertension modérée à l'âge de 4 mois (Rivière *et al.*, 2005). L'expression de l'*Angiotensin-Converting Enzyme 2* (ACE2), connue pour moduler la pression artérielle, et de l'ACE est augmentée dans ce modèle au

niveau des poumons, ce qui pourrait contribuer en partie à la programmation de l'hypertension (Rivière *et al.*, 2005). Une élévation de la pression systolique est également observée dans certains modèles de restriction protéique (Langley and Jackson, 1994).

2. La surnutrition périnatale

Bien que l'origine du DOHAD repose sur la dénutrition maternelle, le problème de la surnutrition maternelle prend de plus en plus d'ampleur étant donné la pandémie mondiale de l'obésité. En effet, l'augmentation de l'apport énergétique chez la mère entraîne une intolérance au glucose de la descendance qui peut augmenter la prévalence de l'obésité infantile.

Les fœtus soumis à un régime maternel HF présentent des taux plasmatiques élevés de leptine et d'insuline (Gupta *et al.*, 2009). Une élévation du rapport insuline/glucose, de la masse du TA et du taux de triglycérides à la naissance ont également été observés dans ce type de modèle (Guo and Jen, 1995). L'ensemble de ces altérations peut conduire à un état d'obésité chez l'adulte (Naef *et al.*, 2008 ; Walker *et al.*, 2008). Il existe d'autres modèles HF appelés régimes « cafétéria » qui prennent en compte l'appétence du régime en l'enrichissant non seulement en lipides mais également en sucre et en sel. Ce type de régime augmente l'adiposité chez la descendance et plus spécifiquement chez les femelles (Bayol *et al.*, 2008).

L'obésité maternelle induit également une augmentation de l'expression génique du NPY, de l'AgRP et de la POMC dans l'hypothalamus du nouveau-né à la naissance (Gupta *et al.*, 2009). Outre les altérations géniques observées, ce régime affecte la sensibilité centrale à la leptine qui se traduit par une diminution de la phosphorylation de STAT3 induite par la leptine chez la descendance (Férezou-Viala *et al.*, 2007). De plus, cet environnement intra-utérin obésogène influence la mise en place des connexions neuronales hypothalamiques. En effet, les animaux nés de mères obèses présentent des altérations du développement des connexions des neurones à AgRP (Kirk *et al.*, 2009). Les effets délétères de l'obésité maternelle sur le développement hypothalamique ne se limitent pas aux perturbations de la mise en place des projections axonales durant le développement postnatal. La neurogenèse hypothalamique embryonnaire est également sous l'influence du régime HF. L'application de ce régime tout au long de la gestation stimule la prolifération de précurseurs des neurones

durant le développement embryonnaire et leur différenciation en neurones orexigènes dans l'hypothalamus mature (Chang *et al.*, 2008). Il semblerait donc que le régime HF imposé pendant des périodes critiques du développement modifie et programme l'architecture des circuits neuronaux.

Des études indiquent que l'alimentation néonatale aurait un rôle important dans la programmation des circuits hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, dans la mesure où les noyaux hypothalamiques se mettent en place jusqu'au 20^{ème} jour de vie postnatale, la lactation chez le raton apparaît comme une période critique dans le développement du comportement alimentaire (pour revue Bouret, 2009). La réduction de la taille des portées augmente la consommation de lait et la prise de poids en stade postnatal précoce (Plagemann *et al.*, 1992). Ces animaux sont hyperphagiques, hyperleptinémiques, hyperinsulinémiques dès le 10^{ème} jour de vie postnatale et présentent une masse pondérale ainsi qu'une adiposité élevée tout au long de leur vie (Plagemann, 2006). Si le régime HF durant la gestation et la lactation chez le rat induit une hypertrophie des adipocytes chez la descendance (Bayol *et al.*, 2005), la surnutrition par réduction de la taille de la portée durant la même période entraîne l'hyperplasie du TA (Dugail *et al.*, 1986). Ces altérations métaboliques seraient en partie dues à une inhibition de l'effet de la leptine et de l'insuline sur les neurones du NA (Davidowa *et al.*, 2003 ; Davidowa and Plagemann, 2007). Ces perturbations sont amplifiées par un régime HF dès le sevrage. La sensibilité au régime HF pourrait être due à l'hyperphagie des animaux qui ne sont pas capables de réguler aussi rapidement que les témoins leur apport calorique en diminuant leur prise alimentaire. De plus, ces animaux n'augmentent pas leur activité physique et ont une thermogénèse diminuée. L'ensemble de ces données indique que des altérations de l'apport nutritionnel durant des périodes critiques du développement postnatal peuvent modifier de manière permanente la sensibilité des neurones du NA à la leptine et à l'insuline.

Il existe d'autres modèles de surnutrition néonatale telle que le « *pup in a cup* » qui permet de contrôler la qualité et la quantité de lait ingéré (Patel *et al.*, 1994). En effet, l'enrichissement du lait en carbohydrates induit l'hyperphagie et l'obésité chez la descendance. Ces altérations seraient dues à l'augmentation de l'expression génique de peptides orexigènes (Srinivasan *et al.*, 2008). Cette étude montre qu'un simple changement en nutriment sans modification de l'apport calorique, peut également induire une programmation foetale.

Malgré les différences de concentration en leptine dues à des disparités de l'apport nutritionnel de l'environnement en fonction des modèles, ce sont les mêmes altérations métaboliques et structurales qui sont observées entre les modèles de dénutrition et d'obésité maternelle.

B. La restriction protéique

Les animaux issus de mères ayant subi une restriction protéique (RP) présentent des altérations métaboliques et hypothalamiques similaires à ceux issus de mères dénutries. Il semblerait donc que les protéines présentes dans le régime maternel aient un rôle crucial dans le développement de l'hypothalamus (Coupé *et al.*, 2010).

La restriction protéique maternelle (RPM) chez le rat induit une hypoinsulinémie chez la descendance, associée à une augmentation de la concentration protéique de NPY dans le NPV et l'AHL au sevrage (Plagemann *et al.*, 2000b). Cette exposition à une forte concentration de NPY dès la naissance induit une perte de poids chez la femelle à l'âge adulte (Varma *et al.*, 2003).

Lorsque la RPM durant la gestation est suivie d'une adoption par des femelles soumises à un régime standard, les nouveau-nés ont une prise de poids plus importante que celle des nouveau-nés non adoptés (Ozanne *et al.*, 2004). Le « *catch-up* » suivant une RPM semble donc programmer l'obésité et la régulation des hormones orexigènes de la descendance sous régime standard (Desai *et al.*, 2005). Cependant, l'obésité induite par des manipulations de l'apport nutritionnel précoce, ne s'accompagne pas toujours d'une hyperphagie. En effet, les modèles de restriction protéique avec « *catch-up* » chez le rat, ne montrent pas d'altérations de la prise alimentaire, même sous régime HF (Bieswal *et al.*, 2006). Ces animaux présentent pourtant une hyperleptinémie, ce qui laisse suggérer un état de résistance à la leptine.

Chez la souris, l'obésité serait due dans ce modèle, *via* notamment une diminution de l'expression de SREBP-1c, à une accumulation de lipides dans les adipocytes, entraînant leur hypertrophie (Bol *et al.*, 2009). De plus, cette équipe a observé une répartition biphasique de la taille des adipocytes chez la progéniture ayant subi un rebond de croissance (Bol *et al.*,

2009). Les courbes montrent en effet, un pic d'adipocytes hypertrophiés et un second pic d'adipocytes plus petits, ce qui pourrait suggérer l'existence d'une population de précurseurs adipocytaires. L'hypothèse selon laquelle la manipulation nutritionnelle précoce pourrait programmer les capacités de prolifération et de différenciation des préadipocytes semble alors probable. Cependant, des cultures de fractions d'adipocytes provenant du TA périgonadique de nouveau-nés ayant subi une RPM durant la gestation et/ou la lactation sans rebond de croissance, à différents stades du développement, n'ont pas montré de différences de prolifération ou de différenciation des préadipocytes (Bieswal *et al.*, 2004). Il semblerait donc que les préadipocytes ne soient pas programmés par la malnutrition maternelle chez la souris. Ceci suggère que les altérations observées dans le TA seraient dues à des perturbations de l'environnement neuroendocrinien.

Cependant, le même type d'expérience réalisée uniquement sur des préadipocytes de rats plus âgés, montre une diminution de l'expression de PPAR γ et de SREBP-1c, deux marqueurs de différenciation adipocytaire, ainsi qu'une importante prolifération qui contribue à une augmentation de l'expression génique de la leptine à un stade avancé de la différenciation (Bol *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la restriction protéique suivie d'un « *catch-up* » rapide entraîne une augmentation de la prolifération des préadipocytes chez le rat. Ce mécanisme pourrait en partie expliquer l'obésité observée chez ces animaux à l'âge adulte. Ces résultats sont confirmés par une étude montrant une augmentation de la prolifération des préadipocytes d'un facteur 2 sur des cultures d'adipocytes isolées du TA viscéral de rat adulte ayant subi une RPM durant la gestation et la lactation (Zhang *et al.*, 2007). Le décours de la croissance fœtale précoce suite à un RCIU induit par la restriction protéique, apparaît donc comme un critère de très haute importance dans le développement du TA. Ces données semblent se confirmer *in vivo*. En effet, chez le rat, la RPM durant la lactation et la gestation programme à long terme l'expression génique du TA viscéral chez la descendance adulte (Guan *et al.*, 2005). Les auteurs ont en effet, constaté une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération des préadipocytes, dans la différenciation des adipocytes, tel que CEBP-1c, et dans la lipogenèse, comme ACC ou FAS. L'ensemble de ces perturbations évolue en faveur d'un phénomène d'adipogenèse. De plus, les rats ayant subi la RPM ne présentent pas de perturbations morphologiques de leurs adipocytes. L'ensemble de ces résultats indique que l'obésité viscérale induite par la RPM résulterait d'une hyperplasie des adipocytes. La restriction protéique maternelle durant la

gestation et la lactation augmente également la tolérance au glucose *via* notamment l'augmentation de l'expression du récepteur à l'insuline dans les adipocytes du TA viscérale et épидидymal (Shepherd *et al.*, 1997).

D'autres modèles murins modifient à la fois l'environnement foetal et postnatal en associant restriction protéine, surnutrition durant la lactation et régime HF après sevrage. Chez la souris, la descendance présente à 9 mois une masse adipeuse importante, une hyperglycémie, une hypercholestérolémie ainsi qu'une hyperleptinémie (Bol *et al.*, 2009). Des macroarrays réalisés sur ces animaux ont révélé que le profil d'expression génique du TA dépend directement du régime maternel. Parmi les gènes étudiés, des enzymes impliquées dans la lipogenèse sont modulées, ce qui pourrait en partie expliquer la prédisposition au surpoids quand les animaux sont soumis à un régime HF (Bol *et al.*, 2009).

Cependant, un modèle de restriction protéique depuis la mise en reproduction jusqu'à la parturition chez la souris, n'induit pas le développement de l'obésité de la descendance mâle, même sous régime HF (Whitaker *et al.*, 2011). En effet, bien que présentant une hyperphagie sous régime HF, les souris mâles ont une activité locomotrice et un métabolisme élevés, ce qui contribue certainement à limiter le développement d'une obésité viscérale. Les résultats obtenus suite à la RPM semblent donc très dépendants de l'espèce et de la fenêtre d'application du régime durant le développement.

La manipulation d'un seul paramètre reste cependant la principale limite de ces différents modèles. Une équipe a toutefois étudié les effets d'une perturbation de l'environnement nutritionnel associée à des stress de nature variable. Dans ce modèle, des femelles gravides sous régime HF, sont soumises à une exposition au froid ou à la nage forcée (Tamashiro *et al.*, 2009). Cependant, l'addition de ces différents stress n'amplifie pas les altérations métaboliques connues pour être induites par le régime HF.

C. La composante génétique

Comme nous venons de le voir, les facteurs environnementaux déterminent le degré d'altérations des noyaux hypothalamiques, et plus particulièrement du NA. Cependant, l'aspect génétique peut également expliquer l'architecture des connexions hypothalamiques puisqu'il est désormais établi que l'obésité résulte de l'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux.

Les modèles d'obésité induite par l'alimentation (OIA) disposent d'un mode de transmission polygénique chez le rat, et représentent un outil de choix dans la compréhension de l'influence de la composante génétique lors de la formation des circuits hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Ces animaux présentent en effet, une sensibilité centrale à la leptine réduite dès le 10^{ème} jour de vie postnatal, avant de développer un état d'obésité (Bouret *et al.*, 2008). Cette insensibilité pourrait être due à la fois à une perturbation de la liaison de la leptine sur son récepteur et à une diminution de l'expression génique de ce récepteur au niveau de l'hypothalamus, entraînant une diminution des réponses anorexigènes (Levin *et al.*, 2004 ; Irani *et al.*, 2007). Les perturbations de la réponse neuronale à la leptine semblent influencer la mise en place des circuits neuronaux hypothalamiques. En effet, la densité des projections du NA vers le NPV est diminuée chez la descendance OIA, ce qui pourrait en partie s'expliquer par une diminution de la sensibilité des neurones du NA à l'action neurotrophique de la leptine (Bouret *et al.*, 2008).

D. L'exposition fœtale aux glucocorticoïdes

Parmi les hypothèses tentant de faire le lien entre un petit poids de naissance et l'apparition de pathologies métaboliques à l'âge adulte, la surexposition aux glucocorticoïdes est l'une des plus étudiée. Chez le rat, l'administration de DEX durant la gestation va en effet, induire un petit poids de naissance ainsi qu'une intolérance au glucose et une hypertension prononcée chez la descendance (Levitt *et al.*, 1996 ; Nyirenda *et al.*, 1998). C'est plus précisément le transfert des glucocorticoïdes de la mère vers le fœtus, qui semblerait être impliqué dans l'augmentation de la pression artérielle (Benediktsson *et al.*, 1993). De plus,

l'inhibition de la synthèse des glucocorticoïdes maternels par la métopyrone, un inhibiteur de la 11 β -HSD1, dans un modèle de restriction protéique, prévient le développement de l'hypertension chez la descendance (Langley-Evans, 1997). Lorsqu'elle est injectée la dernière semaine de gestation, la DEX entraîne une diminution du poids des fœtus et une augmentation de celle de leur TA (Cleasby *et al.*, 2003). Ces animaux présentent également une augmentation de l'expression génique du récepteur GR dans le TA et de la concentration en corticostérone plasmatique. Malgré les effets connus des glucocorticoïdes sur le métabolisme glucidique, aucun effet sur la recapture du glucose par le TA n'a été observé. La DEX induit également une hyperleptinémie maternelle, une diminution de l'expression génique et protéique du récepteur Ob-Rb dans le placenta, ainsi qu'une diminution du transport placentaire de la leptine, se traduisant par une hypoleptinémie fœtale (Sugden *et al.*, 2001 ; Smith and Waddell, 2002). Chez le rat, à 12 mois, la descendance mâle présente une hyperinsulinémie et une hyperleptinémie, sans lien apparent avec les altérations fœtales précédemment énoncées (Sugden *et al.*, 2001). Couplé à un régime HF après sevrage, le traitement à la DEX la dernière semaine de gestation, entraîne une variation d'expression des gènes impliqués dans le stockage et la libération des lipides dans le TA, de manière dépôt-spécifique (Drake *et al.*, 2010). Ces perturbations n'amplifient cependant pas le phénotype d'obésité induit par le régime HF. L'expression de la lipoprotéine lipase est augmentée dans le TA viscéral suite au régime HF chez les rats contrôles, mais n'est pas modulée chez les rats traités à la DEX. Ces résultats suggèrent que les rats DEX ne stockent pas préférentiellement leur excès de lipides dans le TA viscéral sous régime HF, mais présenteraient un excès d'acides gras libres dans le foie (Drake *et al.*, 2010). Cette programmation par les glucocorticoïdes pourrait être en partie due à des modulations de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie glucidique (Cleasby *et al.*, 2003).

E. L'insuffisance placentaire : modèle de ligature de l'artère utérine

Une des causes majeures d'une dénutrition fœtale est l'insuffisance placentaire qui induit une diminution des réserves des substrats chez le fœtus. En effet, l'insuffisance utéro-placentaire induit un RCIU sans perturber l'état physiologique de la mère et augmente la masse adipeuse viscérale de la descendance mâle, ainsi que l'expression génique de PPAR γ dans le TA viscéral (Joss-Moore *et al.*, 2010). L'insuffisance utéro-placentaire est également

associée à une augmentation de l'expression génique du NPY chez le fœtus mais sans élévation des taux protéiques (Rajakumar *et al.*, 1998). Le modèle le plus répandu est celui de la ligature de l'artère utérine qui diminue le flux sanguin vers le placenta et entraîne une insuffisance placentaire. La descendance développe alors une résistance à l'insuline ainsi qu'une intolérance au glucose qui peuvent à terme entraîner le développement d'un diabète de type 2 (Simmons *et al.*, 2001).

Objectifs

Des données épidémiologiques indiquent que la prévalence du SM est en constante augmentation dans le monde, ce qui en fait un problème de santé publique majeur. Il semble donc nécessaire d'améliorer les connaissances sur les mécanismes précoces impliqués dans l'apparition de pathologies liées au SM pour en permettre le dépistage et à terme le traitement. Comme nous avons pu le voir, l'hypothèse de programmation fœtale émise par Barker stipule que l'environnement fœtal, et tout particulièrement la DM, est capable de contrôler le développement du fœtus et/ou du nouveau-né. Il en résulte une augmentation du risque de développer des pathologies métaboliques telles que l'hypertension, le diabète de type 2 ou l'obésité à l'âge adulte.

Un modèle de programmation fœtale chez le rat, par restriction alimentaire maternelle de 70% pendant toute la durée de la gestation, a été développé au laboratoire : le modèle FR30. Une première étude a montré que les rats mâles adultes FR30 présentaient une hypertension artérielle modérée, une des pathologies associées au SM (Rivière 2005). Ces résultats préliminaires suggéraient que ce modèle était un bon outil pour appréhender les mécanismes programmés à l'origine de l'apparition d'autres traits du SM.

Le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique résulte d'un dialogue entre les tissus périphériques et le cerveau, par voies nerveuses et hormonales. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'altération des boucles de régulation et de l'expression des facteurs hypothalamiques contrôlant l'homéostasie énergétique et la prise alimentaire, pourrait être, en partie, à l'origine de la mise en place de pathologies chez les rats mâles FR30 adultes.

L'objectif de ma thèse a donc été d'essayer de mieux comprendre les mécanismes tissulaires, cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la dérégulation de l'homéostasie énergétique et de la prise alimentaire chez la descendance mâle FR30 adulte. Devant la complexité des mécanismes mis en jeu et l'ampleur du travail, nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur les principaux acteurs de la régulation de la balance énergétique : le TA et le NA de l'hypothalamus.

Articles

Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring

Breton C., Lukaszewski M.A., Risold P.Y., Enache M., Guillemot J., Rivière G., Delahaye F., Lesage J., Dutriez-Casteloot I., Laborie C., Vieau D

American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism

L'hypothalamus, de par son action centrale dans la régulation de la balance énergétique, joue un rôle essentiel dans la programmation fœtale et le développement néonatal. Chez le raton, de nombreuses études montrent que des altérations du développement de l'hypothalamus conduisent à des perturbations du métabolisme énergétique chez l'adulte. En effet, plusieurs modèles de programmation fœtale, tels que la restriction protéique ou la surnutrition maternelle durant la gestation, conduisent à des modifications de l'architecture des connexions neuronales de l'hypothalamus et à une programmation d'altérations de la régulation de la prise alimentaire qui, à terme, induisent une obésité associée à une perturbation de la réponse aux hormones du métabolisme énergétique.

Parmi les facteurs hypothalamiques potentiellement impliqués dans la programmation fœtale, la leptine semble avoir un rôle central comme l'ont démontré les travaux de Vickers dans un modèle de DM apparenté au nôtre. En effet, Bouret *et al* ont montré que la leptine a un rôle trophique dans la mise en place des connexions hypothalamiques impliquées dans la régulation de la prise alimentaire. De plus, il a été montré au laboratoire que la DM diminue la concentration de leptine postnatale et altère l'architecture des connexions des neurones à POMC, ainsi que son expression génique chez le nouveau-né mâle (Delahaye *et al.*, 2008). Cependant, peu de données sont disponibles quant au devenir de la régulation métabolique chez la descendance adulte suite à la DM.

Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle la DM prénatale programmerait à long terme, des perturbations développementales de l'hypothalamus et de son expression génique, ainsi que des altérations de la sécrétion d'hormones clés du métabolisme modulant son activité, telles que la leptine et l'insuline, résultant en une dérégulation de la balance énergétique.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons étudié différents paramètres impliqués dans la régulation de la prise alimentaire chez la descendance mâle FR30 âgée de 4 mois. Des mesures physiologiques, cellulaires et moléculaires ont été effectuées en condition basale et en réponse à un jeûne de 48 heures.

Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring

Christophe Breton,¹ Marie-Amélie Lukaszewski,¹ Pierre-Yves Risold,² Mihaela Enache,¹ Johann Guillemot,¹ Guillaume Rivière,¹ Fabien Delahaye,¹ Jean Lesage,¹ Isabelle Dutriez-Casteloot,¹ Christine Laborie,¹ and Didier Vieau¹

¹Neurosciences et Physiologie Adaptatives, UPRES EA 4052, Equipe Dénutritions Maternelles Périnatales, SN4, Université de Lille I, Villeneuve d'Ascq; and ²Oestrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central, UPRES EA 3182, Besançon, France

Submitted 3 September 2008; accepted in final form 10 December 2008

Breton C, Lukaszewski M, Risold PY, Enache M, Guillemot J, Rivière G, Delahaye F, Lesage J, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Vieau D. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E462–E472, 2009. First published December 16, 2008; doi:10.1152/ajpendo.90740.2008.—Epidemiological studies suggest that maternal undernutrition predisposes the offspring to development of energy balance metabolic pathologies in adulthood. Using a model of a prenatal maternal 70% food-restricted diet (FR30) in rats, we evaluated peripheral parameters involved in nutritional regulation, as well as the hypothalamic appetite-regulatory system, in nonfasted and 48-h-fasted adult offspring. Despite comparable glycemia in both groups, mild glucose intolerance, with a defect in glucose-induced insulin secretion, was observed in FR30 animals. They also exhibited hyperleptinemia, despite similar visible fat deposits. Using semiquantitative RT-PCR, we observed no basal difference of hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) gene expression, but a decrease of the OB-Rb and an increase of insulin receptor mRNA levels, in FR30 animals. These animals also exhibited basal hypercorticosteronemia and a blunted increase of corticosterone in fasted compared with control animals. After fasting, FR30 animals showed no marked reduction of POMC mRNA levels or intensity of β -endorphin-immunoreactive fiber projections. By contrast, NPY gene expression and immunoreactive fiber intensity increased. FR30 rats also displayed subtle alterations of food intake: body weight-related food intake was higher and light-dark phase rhythm and refeeding time course were modified after fasting. At rest, in the morning, hyperinsulinemia and a striking increase in the number of c-Fos-containing cells in the arcuate nucleus were observed. About 30% of the c-Fos-expressing cells were POMC neurons. Our data suggest that maternal undernutrition differently programs the long-term appetite-regulatory system of offspring, especially the response of POMC neurons to energy status and food intake rhythm.

maternal undernutrition; appetite programming; hypothalamus; arcuate nucleus; feeding rhythm

IN ADDITION TO LIFESTYLE and dietary factors, increasing evidence suggests that the origin of some metabolic disorders that manifest in adult life may be traced to development. Indeed, epidemiological studies have shown that adverse environmental factors leading to intrauterine growth retardation (IUGR) and low birth weight may predispose individuals to later onset of energy balance metabolic pathology development (9, 17, 18,

20, 29). This has led to the concept of the developmental origin of adult diseases, also called “fetal programming,” or the Barker hypothesis (4). As illustrated by the Dutch Famine Study, offspring of women exposed to famine during early pregnancy displayed an increased risk of adiposity and glucose intolerance, as well as hypertension, later in life (41).

To obtain insights into the underlying mechanisms, numerous animal models, including maternal undernutrition, have been developed to promote intrauterine fetal programming (47, 56). These studies confirmed that impaired fetal development has long-term metabolic consequences, sensitizing the offspring to hyperphagia and obesity, particularly when they are fed a hypercaloric diet (22, 26, 53), reduced leptin and insulin sensitivity (10, 26, 50, 51), type 2 diabetes (43), and elevated blood pressure (32, 44). In adults, the pivotal role of the hypothalamus, especially the arcuate nucleus (Arc), in the maintenance of energy homeostasis controlling the nutritional status and energy storage level is well established (45). Peripheral hormones and energetic substrates act on feeding centers by modulating the expression and release of hypothalamic orexigenic and anorexigenic peptides, such as neuropeptide Y (NPY) and α -melanocyte-stimulating hormone [a neuropeptide derived from proopiomelanocortin (POMC) processing in the hypothalamus], respectively (2). Moreover, the hypothalamus plays an essential role in programming of fetal and neonatal development. In rodents, several studies suggest that hypothalamic “malprogramming” begins in utero but continues in early postnatal life during the suckling period, leading to a disturbed organization and, consequently, long-lasting dysfunction in adulthood. Indeed, perinatal (i.e., fetal or neonatal) modification of energy status, such as in uterine artery-ligated rat dams (40), perinatal low-protein-fed rat dams (37, 39), gestational diabetic rat dams (35, 36), and perinatal overfeeding (30, 38) and underfeeding (13, 30, 42) of neonatal rats, may permanently alter the structure of hypothalamic nuclei and the appetite-programming system in later life. These studies have mostly described alterations in NPY neurons, as well as increased gene expression, in fetal and postnatal offspring, supporting the notion that the NPY system is a key target of perinatal developmental programming, possibly disturbing body weight set point (13, 30, 38, 39, 40, 42). By contrast, very few experimental data are available from adult offspring (22, 35).

Address for reprint requests and other correspondence: C. Breton, Neurosciences et Physiologie Adaptatives, UPRES EA 4052, Equipe Dénutritions Maternelles Périnatales, SN4, Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France (e-mail: christophe.breton@univ-lille1.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Among hypothalamic programming factors, a central role for leptin has been suggested by a study in which subcutaneous administration of leptin on postnatal *days 3–13* reversed the hyperphagia and obesity in adult offspring of rats subjected to prenatal undernutrition (54). As a potential mechanism, leptin was found to promote neuronal outgrowth from the Arc to the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) during postnatal development and, thus, is highly involved in the plasticity and hardwiring of the hypothalamic appetite-regulatory circuits (5). In particular, we showed that maternal undernutrition prevents the postnatal surge of plasma leptin, disturbing preferentially the hypothalamic wiring, as well as the gene expression of the anorexigenic POMC, in male rat pups (11). Recently, it was shown that early postnatal blockade of leptin leads to long-term leptin resistance and increased susceptibility to diet-induced obesity in rats (3).

Using a model of prenatal maternal 70% food-restricted diet (FR30) in rats throughout gestation, we previously showed that FR30 induces IUGR and programs some metabolic syndrome features in adult male rat offspring (44). We hypothesized that prenatal maternal FR30 induces developmental programming that durably modifies levels of key circulating factors acting on the hypothalamus, as well as hypothalamic gene expression, in adult offspring. The programmed modifications may result in alterations of long-term energy homeostasis and food intake in adulthood. To test our hypothesis, we investigated endocrine and metabolic parameters, hypothalamic appetite-regulatory factor gene expression, and related peptide levels in nonfasted and 48-h-fasted FR30 and control 4-mo-old rats. This study sheds new light on the manner in which maternal undernutrition disturbs the hypothalamic POMC anorexigenic circuit over the long term, as well as on the peripheral controlling factors that are critically involved in the lifelong regulation of food intake, body weight, and energy metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Animal Model of Programming

Wistar rats (300 g body wt; Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed six per cage in a room maintained on a 12:12-h light-dark schedule (lights on at 0700) and controlled temperature (22–23°C). After 8 days of acclimation, females were mated with a male for 1 night. If spermatozoa were found in vaginal smears, the next day was considered *day 0* of pregnancy. Pregnant females were transferred to individual cages, where they had free access to commercial food [regular rat chow: total digestible energy 2,900 cal/g (16% protein, 3% fat, and 60% carbohydrate); SAFE D04, UAR, Augy, France]. Tap water was available *ad libitum*. Each pregnant dam was randomly assigned to the control (CT, $n = 12$) or food-restricted (FR30, $n = 12$) group. CT pregnant dams were fed *ad libitum*; pregnant dams from the FR30 group were fed 30% (7.2 g) of the daily intake of CT pregnant dams from *day 1* of pregnancy until delivery (*day 21*). At parturition, each litter usually contained 7–13 fetuses. Pups were weighed, and litter size was adjusted to eight pups per dam (males preferred) for CT and FR30 mothers. Feed-restricted pups were nursed by FR30 dams fed *ad libitum* during lactation. To obviate any litter effects, animals used for each experiment were randomly chosen from different litters, and only a limited number of animals ($n = 1–2$) was used from each litter. After they were weaned, all animals were caged individually and fed *ad libitum*. Body weight and food intake of the offspring were measured weekly until adulthood. All parameters of adult male offspring from the CT and FR30

groups were measured at 4 mo of age. Animal use accreditation by the French Ministry of Agriculture (no. 04860) has been granted to our laboratory for experimentation with rats. Experiments were conducted in accordance with the principles of laboratory animal care of the European Communities (European Communities Council Directive of 1986, 86/609/EEC).

Decapitation and Plasma and Tissue Collection

At 2 days before they were killed, animals were randomly divided into two groups ($n = 6$): one group was fasted for 48 h, and the other was fed *ad libitum*. Nonfasted and 48-h-fasted animals were rapidly weighed and killed by decapitation between 9 and 10 AM. Trunk blood samples were collected into prechilled tubes containing EDTA (20 μ l of a 5% solution), gently shaken, and centrifuged at 4,000 g for 10 min at 4°C. Aliquots of the supernatants were stored at –20°C. Hypothalami, liver, and white adipose tissue (WAT) and interscapular brown adipose tissue (BAT) fat pads were rapidly removed, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C. For immunohistochemistry experiments, brains were fixed by intracardiac perfusion using buffered 4% paraformaldehyde solution. For double-label (POMC-c-Fos) *in situ* hybridization experiments, brains were removed and frozen on dry ice and stored at –80°C.

Food Intake

Food consumption was recorded weekly from weaning to adulthood in both groups. Four-month-old CT and FR30 animals ($n = 6$ per group) were housed individually in metabolic cages. After 8 days of acclimation, food intake of rats that remained in their home cages was measured twice a day at the beginning and end of the light phase (9 AM and 6 PM, respectively). All animals were presented with the same amount of food. Intake was measured for 3 consecutive wk by subtraction of the uneaten food and is presented as mean of food intake in grams. After these same animals were fasted for 48 h, we investigated the time course of refeeding between 9 AM and noon in both groups by measuring food intake at regular intervals 1, 2, and 3 h later.

Metabolic Parameters

For intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT), rats were fasted overnight (16 h). Basal blood glucose level was determined using an automatic glucometer (Glucotrend 2, Roche Diagnostics) before the glucose injection (2 g/kg body wt, $n = 12$ per group). Tail vein blood glucose was then measured at 0, 15, 30, 60, and 120 min after injection. For insulin secretion assays, plasma insulin was measured to determine glucose-stimulated secretion at the same time. Plasma insulin concentrations were measured by ELISA (DRG International).

Endocrine Parameters

All plasma endocrine parameters under resting conditions and after 48 h of fasting were investigated using commercially available kits. Blood glucose and plasma insulin levels were determined as described above. Plasma leptin concentrations were measured with an active murine leptin ELISA kit (Diagnostic Systems Laboratories). Plasma corticosterone levels were determined by a competitive enzyme immunoassay (Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK). Assay kits were used to determine the contents of plasma triglycerides and total cholesterol (61238 Triglyceride Enzymatique PAP100, 61218 Cholesterol Liquide, BioMérieux, France), as well as free cholesterol and free fatty acid (catalog nos. 279-47106 and 999-75406, Wako Chemicals, Neuss, Germany). Plasma C-reactive protein (CRP) levels were determined using a CRP ELISA kit (Millipore, Chemicon Products). Each point was measured in duplicate. Sensitivity of the assay was 0.07 ng/ml for insulin, 0.04 ng/ml for leptin, 0.55 ng/ml for corticosterone, and 2.5 ng/ml for CRP, and the intra- and interassay coeffi-

cients of variation were, respectively, 4% and 9.1% for insulin, 5.4% and 7.3% for leptin, 4.9% and 7.8% for corticosterone, and 7% and 8% for CRP.

Semiquantitative RT-PCR

Hypothalamic RNA was extracted and purified ($n = 6$ per group) using the TRIzol reagent (GIBCO BRL, Strasbourg, France). The quality of the total RNA was assessed by determination of the ratio of absorbance at 260 nm to absorbance at 280 nm and by gel electrophoresis in agarose. To ensure appropriate amplification in the exponential phase for each target, we carried out PCR amplification in separate reactions with different numbers of cycles, but with similar amounts of the corresponding cDNA templates generated in single RT reactions. These preliminary experiments allowed us to determine the optimal cycle number for each primer pair for linear semiquantitative amplification, as described and validated elsewhere (6).

Briefly, 3 μ g of total DNase-treated RNA were reverse transcribed into cDNA using 3 μ g of random hexamers and 200 U of Moloney's murine leukemia virus RT (GIBCO BRL). One-thirtieth of the first-strand synthesis reaction was amplified using 1 U of *Taq* polymerase (Qbiogen, Illkirch, France) and forward and reverse primers at 2 μ M each. The cycling parameters were as follows: 94°C for 90 s, 60°C for 90 s, and 72°C for 120 s. Negative control RT-PCR were performed by omission of RT from the reaction mixture or addition of H₂O, instead of cDNA template, to the reaction mixture. The position of the primers and the predicted size of the amplification products are summarized in Table 1. Moreover, the priming sites were separated by an intron, which prevented amplification of any contaminating genomic DNA. Cyclophilin B was used as an internal standard. Each experiment was performed in triplicate and gave similar results. After amplification, the samples were separated on a 1% agarose gel, visualized by ethidium bromide, and quantified by Multi-Analyst software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Relative levels of expression are presented as the densitometric ratio of the test gene to the housekeeping gene (cyclophilin B).

NPY, β -Endorphin, and c-Fos Immunohistochemistry

As previously described (11), brains were postfixed for 24 h in 4% paraformaldehyde in PBS, cryoprotected by incubation for 24 h in 0.05 M PBS containing 20% sucrose, and frozen in liquid nitrogen. The hypothalami were cut into serial 12- μ m sections on a cryostat, mounted on gelatin-coated slides, and stored at -80°C. Sections from FR30 and CT brains ($n = 6$ rats per group) were incubated for 48 h at 4°C in the primary antibodies at the appropriate dilutions in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 10% lactoproteins. The rabbit NPY antiserum (generously provided by Dr. H. Vaudry, University of Rouen, Rouen, France) was used at a dilution of 1:500. The rabbit antiserum to β -endorphin (prepared in our laboratory) was used at a dilution of 1:200. The rabbit anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used at a dilution of 1:500. Labeling was revealed with secondary antibodies conjugated to Cy3TM (1:400 dilution; Jackson Immunoresearch Laboratories, Interchim) or Alexa

Fluor (1:400 dilution; Molecular Probes, Interchim) for 2 h at room temperature. c-Fos immunoreactivity was revealed with a peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (1:500 dilution; Vector Laboratories, Burlingame, CA). c-Fos protein was visualized using a nickel-intensified diaminobenzidine reaction to produce a black precipitate in cell nuclei. Semiquantitative analysis of the immunoreactive fibers projecting to different nuclei was based on averages of 20–50 coronal sections from 6 rats, depending on the area investigated. Images were observed on a fluorescence microscope (Olympus). Fluorescent images of coronal sections were captured spanning most of the nucleus investigated. Fibers were considered labeled when their respective staining was clearly above background. Semiquantification of fluorescence intensity was performed using image analysis software (analysis 3.0, Soft Imaging System, Olympus), as previously described (11), and the relative density of NPY- and β -endorphin-immunoreactive fibers was assigned a score ranging from + to +++++ (see Table 3; also see Figs. 5 and 6).

Double-Label In Situ Hybridization

Coronal sections (12 μ m thick) throughout the Arc were cut with a cryostat, mounted onto gelatin-coated slides, and air-dried. POMC and c-Fos RT-PCR fragments (Table 1) were subcloned into pGEM-T Easy, linearized, and used as riboprobes. The ³⁵S-labeled c-Fos cRNA probe was mixed with the digoxigenin-labeled POMC cRNA probe in hybridization buffer (³⁵S-labeled probe at 1.5×10^6 disintegrations/min and 50 ng of digoxigenin-labeled probe in 50 μ l of buffer). Coverslips were applied, and the sections were hybridized at 55°C overnight. The coverslips were removed, and the slides were rinsed three times for 10 min each in 2 \times saline-sodium citrate (SSC) at room temperature. The slides were digested with RNase A (20 μ g/ml) for 45 min, washed twice for 5 min each in 2 \times SSC, once for 10 min in 1 \times SSC, and once for 10 min in 0.5 \times SSC at room temperature and then washed twice for 30 min each in 0.1 \times SSC at 55°C. The slides were then washed briefly in *buffer A* [100 mM Tris·HCl (pH 7.5) and 150 mM NaCl] and incubated for 30 min at room temperature in blocking reagent (Boehringer Mannheim). Then the slides were washed briefly in *buffer A* and incubated for 3 h at 37°C in anti-digoxigenin alkaline phosphatase-conjugated antibody (Boehringer Mannheim) diluted 1:1,000 in *buffer A*. The slides were rinsed twice for 15 min each in *buffer A* and once for 10 min in *buffer B* [100 mM Tris·HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, and 50 mM MgCl₂] at room temperature. Then the slides were incubated for 3 h at 37°C in *buffer B* with 0.34 mg/ml nitro blue tetrazolium salt and 0.18 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt (Boehringer Mannheim). The slides were washed in 10 mM Tris·HCl (pH 8.0) and 1.0 mM EDTA to stop the chromogen reaction. Then the slides were placed in 70% ethanol for 15 s and air-dried. The slides were then dipped in 60% collodion (Wako Chemical) dissolved in isoamyl acetate, air-dried, and dipped in autoradiography emulsion. After 20 days of exposure, the slides were developed and mounted in an aqueous mounting medium. To assess the nonspecific labeling with digoxigenin-labeled probe and ³⁵S-labeled probe, we used sense RNA

Table 1. Primers used for semiquantitative RT-PCR analysis

mRNA	Accession No.	PCR Product, bp	Primer Position		No. of Cycles
			Forward	Reverse	
Cyclophilin B	AF071225	456	155–179	586–610	23
POMC	AF510391	379	79–103	434–458	25
NPY	M20373	354	63–87	393–417	30
Leptin receptor (OB-Rb)	NM_012596	544	2265–2285	2788–2808	34
Insulin receptor	NM_017071	332	4110–4134	4417–4441	33
c-Fos	X06769	546	434–458	955–979	35

Accession numbers correspond to mRNA sequences. POMC, proopiomelanocortin; NPY, neuropeptide Y.

probes on some adjacent sections from experimental animals, but we detected no specific signal. To estimate the percentage of POMC cells coexpressing the c-Fos gene, we examined six sections per animal, including the ventromedial part of the hypothalamus, at high magnification under bright-field illumination. Under these conditions, POMC mRNA-containing cells appear as dark-colored cell bodies and c-Fos mRNA-containing cells as autoradiographic clusters.

Statistical Analysis

Values are means \pm SE. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA (with prenatal undernutrition and diet as factors) followed by Newman-Keuls post hoc analysis. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Dam and Litters

There were no significant differences in the number of progeny per dam [9.8 ± 1.5 and 7.8 ± 0.8 pups/litter from CT and FR30 dams ($n = 12$ each), respectively, $P =$ not significant (NS)] or the ratio of male births to total births in each litter (0.59 ± 0.09 and 0.46 ± 0.06 for CT and FR30 dams, respectively, $P =$ NS). Maternal undernutrition resulted in fetal growth retardation, as reflected by decreased body weight at birth. As shown in Table 2, the body weights of male newborn pups differed between the CT and FR30 groups: 6.29 ± 0.11 and 4.45 ± 0.13 g ($n > 30$ each), respectively ($P < 0.001$). Body weight of FR30 rats born at full term was reduced by $\sim 30\%$. From birth until adulthood, body weight of FR30 rats remained lower until 4 mo of age.

Adult Male Rats

Body composition and plasma hormone levels. As reported in Table 2, body weight of 4-mo-old FR30 rats remained reduced $\sim 11\%$ compared with CT rats (473.2 ± 7.2 vs. 422.5 ± 6.8 g, $n > 30$ each, $P < 0.001$), reflecting a partial postnatal catch-up growth. There were no significant absolute weight differences in the liver or the WAT (perirenal, epididymal, and subcutaneous) and interscapular BAT fat pads in 4-mo-old CT rats compared with maternal undernourished

animals. Although their body weight was reduced, no change was observed in fat pads of FR30 rat adult offspring. When expressed relative to body weight, the weights of the perirenal, epididymal, and subcutaneous WAT fat pads were increased by 23%, 21%, and 12%, respectively, whereas the weight of the interscapular BAT fat pad was decreased by 12%.

Plasma triglyceride contents significantly decreased, whereas free fatty acid levels increased, after fasting in both groups. However, at 4 mo of age, regardless of the feeding conditions (fasted or nonfasted), no significant difference was noted in plasma lipid parameters between FR30 and CT rats. Nonfasting and fasting leptin concentrations were ~ 1.5 -fold higher in FR30 than CT rats: 11.82 ± 1.71 vs. 6.28 ± 0.99 ng/ml ($n = 6$ each, $P < 0.05$) and 4.45 ± 0.49 vs. 2.63 ± 0.56 ng/ml ($n = 6$ each, $P < 0.05$) in nonfasted and fasted animals, respectively. In the nonfasted condition, corticosterone concentrations were about fourfold higher in FR30 than CT animals: 4.60 ± 1.86 vs. 1.24 ± 0.25 μ g/dl ($n = 6$ each, $P < 0.05$). In CT animals, serum corticosterone concentration was ~ 25 -fold higher in the fasted than nonfasted condition: 31.21 ± 1.82 vs. 1.24 ± 0.25 μ g/dl ($n = 6$ each, $P < 0.01$). By contrast, 48-h-fasted FR30 rats showed no significant increase of corticosteronemia compared with nonfasted FR30 animals. Plasma CRP was increased in nonfasted FR30 compared with CT animals (43.81 ± 4.11 vs. 30.56 ± 3.06 μ g/ml, $n = 6$ each, $P < 0.05$), whereas no difference was observed between fasted FR30 and CT animals.

Glucose tolerance test and insulin response. The glucose and insulin curves from the IPGTT are shown in Fig. 1, A and B. CT and FR30 rats had comparable nonfasted, as well as fasted, blood glucose concentrations (Table 2). In the nonfasted state, insulin concentrations were higher in the FR30 than CT animals (4.34 ± 0.59 vs. 2.71 ± 0.32 μ g/l, $n = 12$ each, $P < 0.01$), whereas in the fasted state, insulin levels of FR30 animals were not different from those of CT animals (Table 2). However, as depicted in Fig. 1A, plasma glucose was significantly higher in FR30 than CT rats ($n = 12$ per group) during the IPGTT at 30 min ($P < 0.05$) and 60 min ($P < 0.01$). This partial glucose intolerance of FR30 animals might be explained

Table 2. Effects of maternal undernutrition (FR30) on birth weight and morphometric and biological parameters of adult rats at rest and after 48 h of fasting

	CT		FR30	
	Nonfasted	Fasted	Nonfasted	Fasted
Birth wt, g	6.29 ± 0.11		4.45 ± 0.13^c	
Adult body wt, g	473.2 ± 7.2	450.8 ± 5.6^e	422.5 ± 6.8^b	$398.6 \pm 9.5^{b,e}$
Liver wt, g	11.88 ± 1.75		11.68 ± 1.02	
Perirenal WAT wt, g	9.97 ± 3.44		10.95 ± 3.98	
Epididymal WAT wt, g	10.66 ± 4.23		11.55 ± 4.11	
Subcutaneous WAT wt, g	0.59 ± 0.17		0.59 ± 0.32	
Interscapular BAT wt, g	0.33 ± 0.13		0.26 ± 0.10	
Triglycerides, mg/dl	128.16 ± 41	34.02 ± 12.5^f	146.37 ± 25	39.38 ± 6.7^f
FFA, mmol/l	0.34 ± 0.91	0.63 ± 0.08^f	0.42 ± 0.07	0.80 ± 0.12^f
Glucose, g/l	0.96 ± 0.03	0.73 ± 0.03^f	0.95 ± 0.03	0.79 ± 0.04^f
Insulin, μ g/l	2.71 ± 0.32	0.63 ± 0.13^f	4.34 ± 0.59^b	0.62 ± 0.04^f
Leptin, ng/ml	6.28 ± 0.99	2.63 ± 0.56^e	11.82 ± 1.71^a	$4.45 \pm 0.49^{a,f}$
Corticosterone, μ g/dl	1.24 ± 0.25	31.21 ± 1.82^f	4.6 ± 1.86^a	6.53 ± 2.76^e
CRP, μ g/ml	30.56 ± 3.06	36.14 ± 1.75	43.81 ± 4.11^a	35.96 ± 3.73

Values are means \pm SE [$n > 30$ rats/group (for weight values) and $n = 6$ rats/group (for fasted vs. nonfasted)]. WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue; FFA, free fatty acid; CRP, C-reactive protein. ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.001$ vs. CT in the same condition (i.e., fasted or nonfasted). ^d $P < 0.05$; ^e $P < 0.01$; ^f $P < 0.001$ vs. nonfasted.

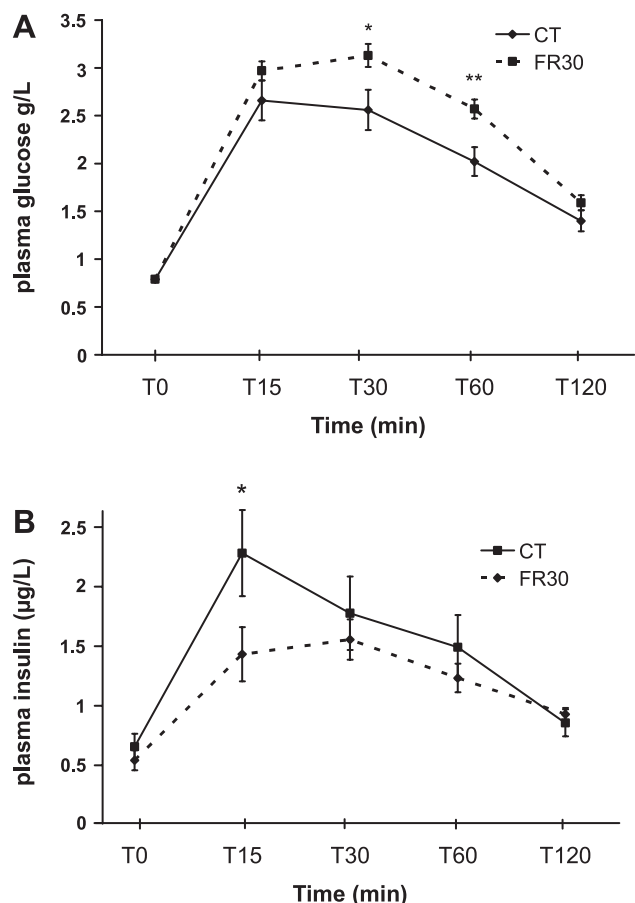


Fig. 1. Time course of plasma glucose (A) and insulin (B) concentrations during an intraperitoneal glucose tolerance test in adult control (CT) rats and rats subjected to a model of prenatal maternal 70% food restriction (FR30). Values are means \pm SE ($n = 12$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, FR30 vs. CT. Note significantly higher glucose levels in FR30 than CT rats at 30 min ($P < 0.05$) and 60 min ($P < 0.01$) in A and less increase above basal insulin levels in FR30 than CT rats after the glucose bolus at 15 min ($P < 0.05$) but no difference from 30 to 120 min in B.

by a defect in glucose-induced insulin secretion and/or a decrease in insulin sensitivity. To test the first hypothesis, we examined potential changes in insulin levels after an intraperitoneal bolus of glucose (Fig. 1B). The increase over basal insulin levels was transiently lower in FR30 than CT rats after the glucose bolus at 15 min ($P < 0.05$), but no difference was observed from 30 to 120 min, reflecting a transient impaired insulin release.

Food intake. As described in Fig. 2C, absolute total daily food consumption over 24 h was similar in CT and FR30 animals in adulthood: 25.11 ± 0.74 and 25.14 ± 0.81 g, respectively ($n = 6$, $P = \text{NS}$). However, weight-related food intake, calculated as energy in food ingested, was higher in FR30 than CT rats: 173 ± 17 vs. 154 ± 12 cal·g body $\text{wt}^{-1} \cdot \text{J}^{-1}$ ($n = 6$ each, $P < 0.05$). Although rats are nocturnal animals, absolute food intake was lower during the dark phase (Fig. 2B; 20 ± 0.77 vs. 22.19 ± 0.71 g, $n = 6$ each, $P < 0.05$) and higher during the light phase (Fig. 2A; 5.14 ± 0.42 vs. 2.88 ± 0.24 g, $n = 6$ each, $P < 0.001$) in the FR30 than CT group, resulting in modified light-dark phase food intake rhythm. Although we observed no significant difference of weight-related food intake during the dark phase between CT

and FR30 rats (137.44 and 136.05 ± 9 cal/g, respectively), FR30 rats displayed much higher weight-related food energy intake during the light phase (35.32 ± 0.43 vs. 17.66 ± 0.63 cal/g, $P < 0.001$). As shown in Fig. 2D, after 48 h of starvation, absolute food intake during the 1st h of refeeding was reduced in FR30 compared with CT animals (5.47 ± 0.47 vs. 6.7 ± 0.13 g, $n = 6$ each, $P < 0.05$), was increased during the 2nd h (2.67 ± 0.48 vs. 1.19 ± 0.41 g, $n = 6$ each, $P < 0.05$), and returned to equal levels during the 3rd h. Measurement of weight-related food intake confirmed lower food energy intake during the 1st h of refeeding (37.59 ± 0.51 vs. 41.08 ± 0.79 cal/g, $P < 0.05$) and much higher food energy intake during the 2nd h of refeeding (18.35 ± 0.63 vs. 7.29 ± 0.21 cal/g, $P < 0.001$) in FR30 than CT rats.

Hypothalamic mRNA contents of NPY, POMC, and leptin and insulin receptors. Using RT-PCR analysis, we were unable to demonstrate any significant difference in hypothalamic NPY and POMC mRNA expression levels between nonfasted FR30 and CT animals (Fig. 3, A and B). However, as expected, fasting state led to expression differences for both neuropeptides. The mRNA levels of hypothalamic NPY increased significantly in fasted compared with nonfasted CT animals ($P < 0.01$), whereas only a tendency to increased expression was observed in fasted FR30 rats (Fig. 3A). We demonstrated a significant decrease in hypothalamic POMC mRNA levels in fasted compared with nonfasted CT animals ($P < 0.05$). However, fasted FR30 animals showed no significant decrease of POMC mRNA levels compared with nonfasted FR30 animals, but POMC mRNA levels were higher in fasted FR30 than fasted CT animals ($P < 0.05$; Fig. 3B). In addition, we detected a significant decrease in the mRNA content of the long isoform of the leptin receptor, OB-Rb ($P < 0.001$), as well as an increase of insulin receptor mRNA level ($P < 0.001$), in the hypothalamus of nonfasted FR30 compared with CT animals. After 48 h of fasting, no variation of OB-Rb mRNA level was observed in CT animals, whereas OB-Rb mRNA levels increased in FR30 rats, returning to a level comparable to that observed in CT animals ($P < 0.001$; Fig. 3C). Insulin receptor mRNA content increased significantly in fasted compared with nonfasted CT animals ($P < 0.001$), whereas insulin receptor mRNA levels did not vary between fasted and nonfasted FR30 animals (Fig. 3D).

Distribution of c-Fos-expressing cells. Animals were killed between 9 and 10 AM. At this stage, under resting conditions, a subtle distribution difference was observed in both groups throughout the ventromedial part of the hypothalamus, where only a few isolated c-Fos-expressing cells were evident. However, FR30 rats exhibited a striking increase in the number of c-Fos-containing cells in the ventral part of the Arc (Fig. 4B) compared with CT animals, which showed far fewer labeled nuclei in this hypothalamic area (Fig. 4A). The pattern of c-Fos induction observed in FR30 animals closely resembles the distribution of POMC-immunoreactive perikarya (data not shown). In addition, CT animals displayed a slight increase in the number of c-Fos-containing cells in the hypothalamic ventromedial nucleus (VMH), whereas no c-Fos labeling was visible in the VMH in FR30 animals (Fig. 4A). At 48 h of fasting, a large decrease was observed in the intensity of c-Fos-immunoreactive nuclei in the ventral Arc of FR30 rats at the limit of detection, whereas a few c-Fos-expressing cells

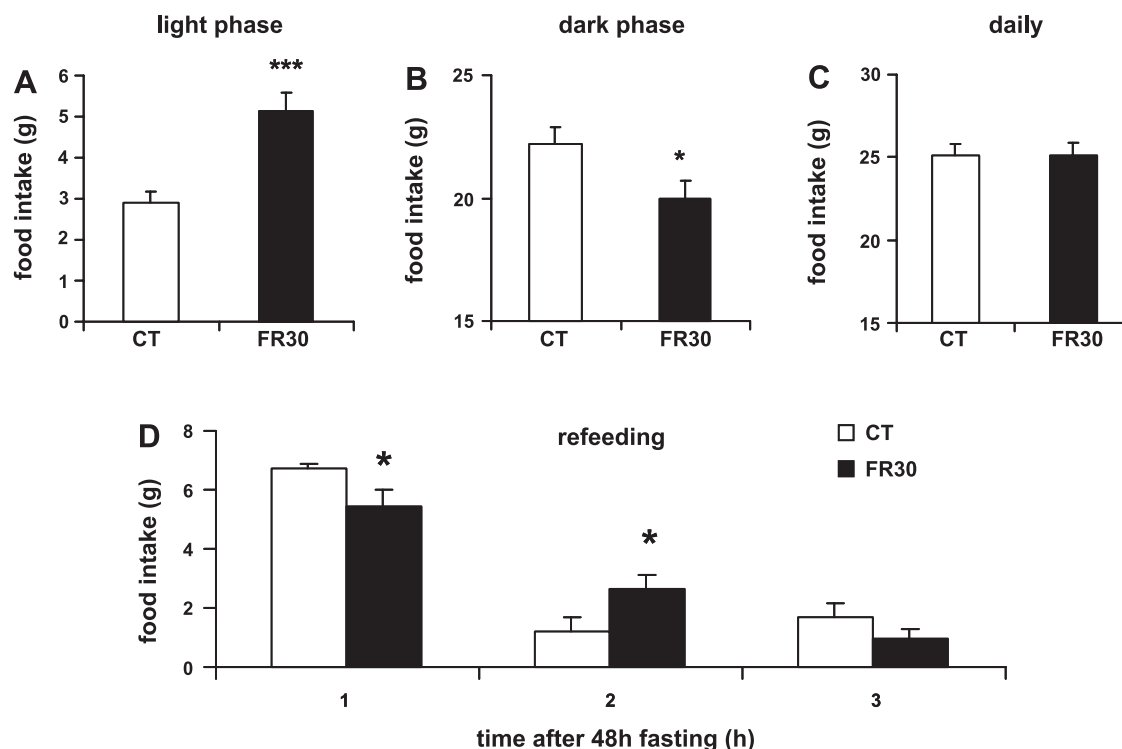


Fig. 2. Light phase (A), dark phase (B), and daily (C) food intake, as well as refeeding after fasting (D), in adult CT and FR30 rats. Rats were transferred individually to a metabolic monitoring system. After 1 wk, food consumption was recorded twice a day for 3 consecutive wk. After 48 h of fasting, time course of refeeding was measured during the first 3 h. Values are means \pm SE ($n = 6$ per group). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs. CT. Absolute total daily food consumption over 24 h was similar in both groups (C). In FR30 rats, absolute food intake was lower during the dark phase (B; $P < 0.05$) and absolute food intake was higher during the light phase (A; $P < 0.001$). After 48 h of starvation, absolute food intake in the 1st h of refeeding was reduced ($P < 0.05$) and food consumption in the 2nd h was increased ($P < 0.05$) in FR30 compared with CT rats, and food consumption returned to equal amounts in the 3rd h in the FR30 and CT groups. After weight adjustment, total daily weight-related food intake calculated as energy in food ingested (cal/g of animal) was higher in FR30 than CT rats. Data confirm much higher food energy intake during the light phase and a modified refeeding response after 48 h of fasting in FR30 rats.

were detectable in CT animals. c-Fos labeling was undetectable in the VMH in fasted CT animals (data not shown).

Colocalization of c-Fos and POMC mRNA. To identify the cells expressing the c-Fos gene in the Arc in FR30 rats, we performed double-label in situ hybridization using a digoxigenin-labeled POMC cRNA and a 35 S-labeled c-Fos cRNA probe. Figure 4D shows a representative coronal section of the ventral part of the Arc processed via double-label in situ hybridization. The distribution of cells expressing the c-Fos gene overlapped the distribution of POMC neurons. Approximately 30% of the c-Fos mRNA-containing cells also expressed the POMC gene.

Immunocytochemistry of NPY- and β -endorphin-containing neurons and fibers. In the fed state, NPY and β -endorphin antisera displayed intensely labeled cell bodies, with the expected pattern in the Arc of CT and FR30 animals. As mentioned above, POMC-containing neurons were distributed throughout the medioventral part of the Arc more ventrally than the NPY-containing perikarya. The distribution and number of NPY- and POMC-immunoreactive perikarya showed no visible difference between CT and FR30 rats. Labeled axons were observed in many brain regions with both antisera. No obvious distribution and intensity differences in the innervation of the brain areas by NPY were observed between FR30 and CT rats (Table 3). Also, there was no visible difference in POMC-immunoreactive fiber distribution and intensity between the two groups in brain

regions such as the PVN (Fig. 5, A and B), the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH), and the paraventricular nucleus of the thalamus (PVT; Fig. 6, A and B; Table 3). As expected, after 48 h of fasting, a similar marked increase in the fluorescence intensity and number of NPY-labeled axons was observed in all brain areas of CT as well as FR30 animals (Table 3). By contrast, no decrease in the fluorescence intensity and number of β -endorphin-labeled axons was observed in fasted FR30 compared with fasted CT animals in the PVN (Fig. 5, C and D), DMH, and PVT (Fig. 6, C and D; Table 3).

DISCUSSION

The principal finding of this study is that maternal prenatal undernutrition leads to alterations of the hypothalamic POMC system in the adult male FR30 rat. Under resting conditions, we observed no obvious differences in the distribution and number of NPY and POMC neurons, the NPY and β -endorphin density of Arc projections, and hypothalamic NPY and POMC gene expression between CT and FR30 rats. However, after fasting, FR30 animals displayed no marked fall of POMC mRNA or β -endorphin-immunoreactive fiber intensity throughout innervated brain areas, whereas NPY mRNA and NPY-immunoreactive fiber intensity were increased. Accordingly, after starvation, food intake was reduced in FR30 rats during the 1st h of refeeding, suggesting an adaptation to fasting. Recent studies pointed out the

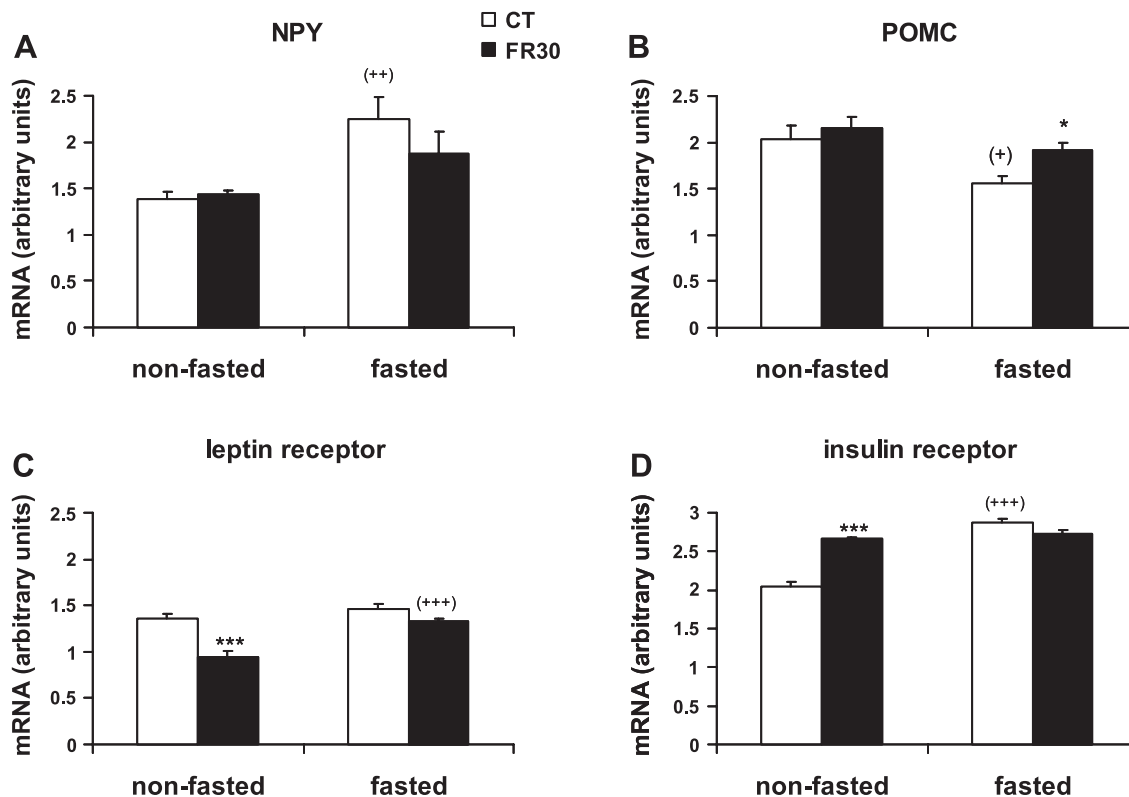


Fig. 3. Semiquantitative RT-PCR analysis of hypothalamic neuropeptide Y (NPY, A), proopiomelanocortin (POMC, B), leptin receptor (C), and insulin receptor (D) mRNA expression relative to cyclophilin B mRNA. Values are means \pm SE [$n = 6$ animals per group (nonfasted and 48-h fasted)]. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs. CT in the same condition. ++ $P < 0.01$; +++ $P < 0.001$ vs. nonfasted. Prenatal undernutrition had no effect on hypothalamic NPY (A) and POMC (B) gene expression in FR30 compared with CT adult offspring in the nonfasted state, whereas leptin (C) and insulin (D) receptor mRNA levels varied between both groups. After 48 h of fasting, fasted FR30 rats showed no marked decrease of POMC mRNA levels compared with nonfasted FR30 animals.

importance of melanocortin in refeeding-induced PVN neuronal activation and satiety (48).

We confirmed that POMC neurons are a hypothalamic target of maternal undernutrition. Indeed, we recently demonstrated a dramatic reduction of the postnatal leptin surge affecting preferentially the anorexigenic POMC system in weanling male rats exposed to a 50% maternal food restriction in late gestation and lactation (11). We hypothesized that lactation may have been compromised in the FR30 dams during the early postpartum period until the increase of food intake could compensate for the deficient state. This might, at least partly, account for subtle perturbations of the POMC system, which continues to develop during the first 2 wk of lactation.

These findings are in agreement with data that showed short- and long-term consequences of manipulation of maternal nutrition and hormone level during the perinatal period on hypothalamic nuclei structure, as well as neuropeptide expression levels, of the offspring (13, 22, 30, 35–39, 40, 42). In contrast to related models that have mostly reported disorganization of the NPY system in offspring (13, 30, 35, 36, 38, 39, 40, 42), alterations of the NPY system in adult FR30 rats are weak, if not negligible. An explanation for such a discrepancy might be that, apart from leptin, mechanisms beyond maternal undernutrition that are thought to influence hypothalamic appetite programming during the perinatal period are largely unknown and might differ depending on the models used.

Despite showing increased food intake relative to body weight, FR30 adult offspring showed reduced body weight and

no change in visible fat pads. Some hypotheses may explain this apparent discrepancy. On the one hand, it has been shown that IUGR might be responsible for somatic growth alterations leading to shorter (body length) and lighter (body weight) rat offspring (21, 25, 53, 55). Thus, in addition to skeletal growth modifications (16, 21), we cannot rule out the possibility that a different lean-to-fat mass ratio due to a deficit in muscle mass and/or different body fat pad distribution occurs in adult FR30 rats (25). To address this question, further experiments, such as absorptiometric studies, are needed to measure the total body composition of FR30 adult rats. On the other hand, additional mechanisms, such as modified spontaneous motor activity and adipose tissue and/or muscle thermogenesis, may also account for increased energy expenditure in FR30 adult rats (12).

FR30 animals exhibited hyperleptinemia, as well as similar visible fat deposits. When expressed relative to body weight, the weights of the white fat pads were increased by ~20% in FR30 compared with CT adult rats. These findings are in agreement with a recent report of hyperleptinemia without an obese phenotype in mice with adipose androgen receptor deficiency (57). As supported by others (26, 51, 53), hyperleptinemia may be interpreted as a leptin-resistant state. 1) At rest, we found no difference in expression of NPY and POMC mRNA levels between FR30 and CT groups. 2) In FR30 rats, lower fasting leptin levels did not modify POMC and NPY mRNA levels, whereas a large increase was found in OB-Rb mRNA levels, which reached the level observed in CT animals. 3) Chronic hyperleptinemia is known to provide important

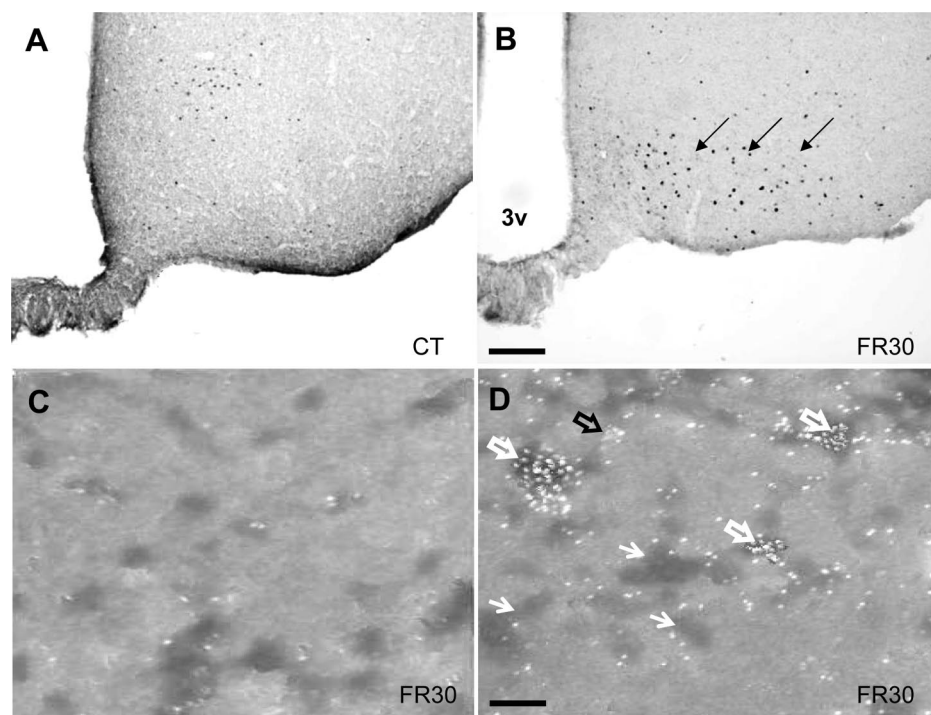


Fig. 4. Representative sections of c-Fos-expressing cells (A and B) and double-label in situ hybridization of POMC and c-Fos mRNA (C and D) in the hypothalamic arcuate nucleus in nonfasted adult CT and FR30 rats. Each image represents similar results from 6 animals. Arrows show an increase in the number of c-Fos-containing cells in the ventral Arc of FR30 rats (B) compared with CT animals, which showed few visible labeled cells in this hypothalamic area (A). Pattern of c-Fos induction observed in FR30 animals closely resembles distribution of POMC-immunoreactive perikarya (data not shown). POMC mRNA-containing cells appear as dark-colored cell bodies; c-Fos mRNA-containing cells are marked by autoradiographic grain clusters (clusters of white dots in D). Section hybridized with c-Fos-labeled sense probe as negative control is shown in C. White arrows indicate representative cells that contain POMC mRNA. In D, some cells in the Arc are double labeled for c-Fos and POMC mRNA (open white arrows), whereas other cells appear to contain only c-Fos (open black arrows) or POMC (white solid arrows) mRNA. 3v, 3rd ventricle. Scale bars, 100 μ m (A and B) and 10 μ m (C and D).

negative feedback to the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by reducing hypothalamic corticotropin-releasing hormone expression (19), whereas FR30 rats continued to display a high basal level of circulating corticosterone. At rest, we also observed a decrease in hypothalamic OB-Rb mRNA levels in FR30 rats. Leptin resistance based on a specific decrease in hypothalamic OB-Rb mRNA has been reported in hyperleptinemic rats (27). In addition, we observed an increase of hypothalamic insulin receptor mRNA levels in FR30 rats. Concurrently, increased hypothalamic insulin signaling, as well as hyperinsulinemia, may also influence leptin sensitivity (33). However, in view of the widespread hypothalamic distribution of leptin and insulin receptors, further studies are required to more precisely localize their expression in hypothalamic nuclei of FR30 compared with CT adult rats. Interestingly, we observed that plasma CRP, a liver-derived protein defined as a low-grade inflammatory marker, was increased in nonfasted FR30 rats. Recent data suggest that leptin resistance may be mediated by circulating CRP, which directly binds

leptin and attenuates its physiological functions by inhibiting the binding of leptin to its receptor (7).

Alternatively, hyperleptinemia might normally stimulate the appetite-programming system. Indeed, in contrast to hyperleptinemia resulting from increased fat mass, enhanced plasma leptin in mice with adipose androgen receptor deficiency did not cause leptin resistance (57). As suggested by others (22, 42), FR30 rats might have developed an adaptive resetting of the neuronal activation threshold, which could explain normalized POMC and NPY gene expression levels. Leptin is known to increase c-Fos expression only in POMC neurons (15). Thus the increase of the number of c-Fos-expressing POMC neurons in the ventral Arc might result from chronic leptin activation in FR30 rats. In addition, we cannot rule out the possibility that hyperleptinemia in FR30 rats might impede the decrease of POMC gene expression after fasting (1). Additional experiments are needed to investigate the leptin-induced activation of the signal transducer and activator of transcription 3 or suppressor of cytokine signaling 3 (33) gene expression levels in distinctive populations of Arc neurons.

Taken together, our data suggest that the appetite-regulatory mechanisms would be differently programmed in FR30 rats. The fact that FR30 adult rats displayed higher body weight-related food intake, despite no change in basal POMC and NPY, raises the question about the mechanisms underlying long-term hypothalamic energy regulation. In addition to the Arc, it would be important to determine the role of other hypothalamic nuclei, such as the VMH, DMH, PVN, and lateral area, which also contain numerous orexigenic and anorexigenic factors that play an important role in food intake regulation.

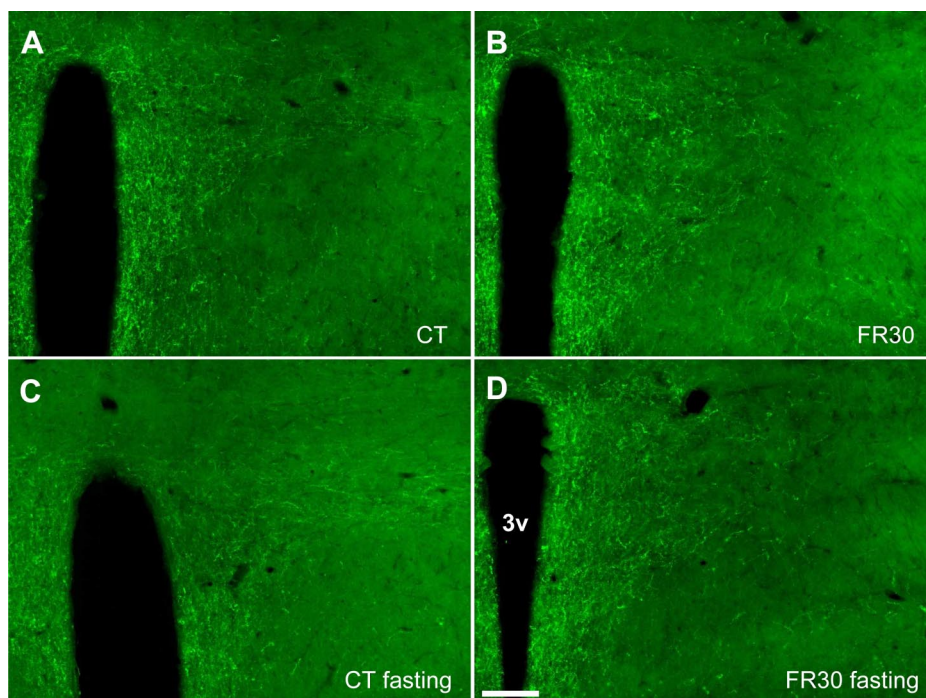
We previously showed that maternal undernutrition programs the HPA axis of the offspring throughout its lifespan (28). In particular, perinatal maternal food restriction led to

Table 3. Estimation of the labeling intensity of β -endorphin- and NPY-immunoreactive fibers in paraventricular and dorsomedial hypothalamic nuclei, as well as paraventricular nucleus of thalamus of adult rats

	β -Endorphin	NPY
Nonfasted		
CT	+++	+++
FR30	+++	+++
Fasted		
CT	+	+++++
FR30	+++	+++++

Labeling intensity of fibers provided by β -endorphin and NPY antisera was scored as follows: +++++, intense; +++, moderate; +, low. Similar variations were observed in the different areas investigated.

Fig. 5. Immunohistochemical detection of POMC neuron fiber projections in the hypothalamic paraventricular nucleus in nonfasted and fasted adult CT and FR30 rats. Each image represents similar results from 6 animals. POMC-immunoreactive fiber distribution and intensity did not differ significantly between nonfasted CT (A) and FR30 (B) animals. Fasted FR30 animals (D) exhibited no decrease in fluorescence intensity and number of β -endorphin-labeled axons compared with fasted CT animals (C). Scale bar, 100 μ m.

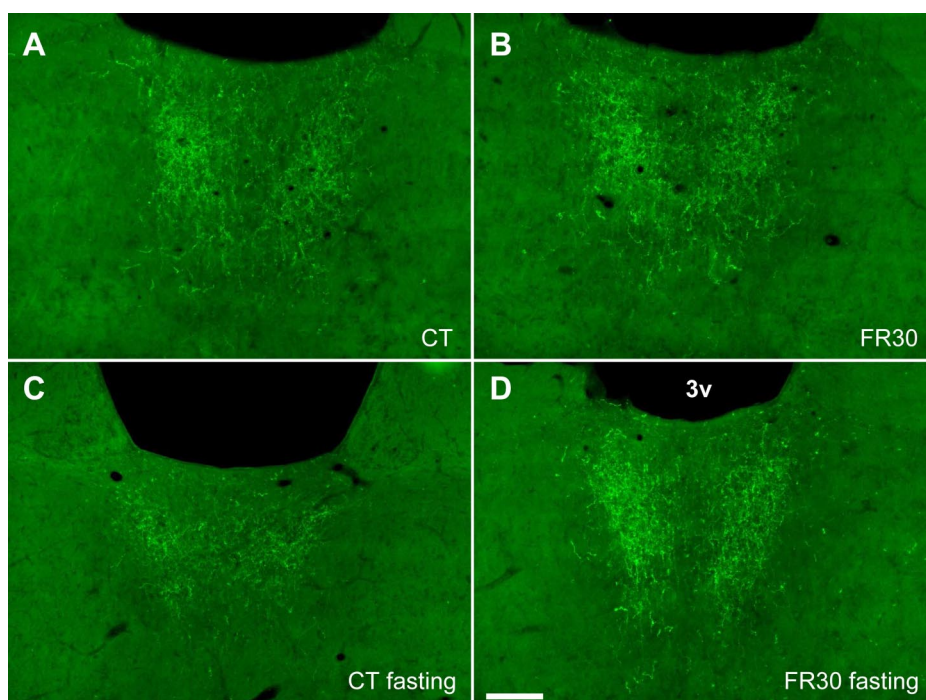


hypercorticoesteronemia accompanied by disturbed glucocorticoid feedback, leading to 8-mo-old male rats that were unable to cope with severe stress (14, 46). Our data demonstrated hypercorticoesteronemia in FR30 rats as early as 4 mo of age and a blunted increase of corticosterone after fasting. Hypothalamic POMC system perturbations might, at least partly, be responsible for altered HPA activity (19, 52). Indeed, fasted FR30 rats displayed modifications of POMC-derived peptide-labeled axons in brain areas involved in HPA axis regulation, such as the PVN (19, 52) and PVT (23). Accordingly, a recent

study showed elevated basal plasma corticosterone, elevated basal but attenuated stress-induced ACTH secretion, and inappropriately elevated corticotropin-releasing hormone expression in the PVN in POMC-deficient (POMC^{-/-}) mice with the selective restoration of pituitary POMC (49).

Chronic increased circulating glucocorticoids are known to raise glycemia by promoting gluconeogenesis, insulin resistance, and reduced insulin secretion (8). However, glucose and insulin concentrations were similar in fasted FR30 and CT animals, whereas mild glucose intolerance accompanied by a

Fig. 6. Immunohistochemical detection of POMC neuron fiber projections in the paraventricular nucleus of the thalamus in nonfasted and fasted adult CT and FR30 rats. Each image represents similar results from 6 animals. POMC-immunoreactive fiber distribution and intensity exhibited no obvious difference between nonfasted CT (A) and FR30 (B) animals. Fibers immunostained for β -endorphin were abundant in fasted FR30 animals (D) and displayed no decrease in fluorescence intensity and number of labeled axons compared with fasted CT animals (C). Scale bar, 100 μ m.



defect in glucose-induced insulin secretion was observed in fasted FR30 animals. Contrary to the rat FR30 model described by Vickers and others (26, 53–55), we observed no difference in the plasma insulin levels between the fasted CT and FR30 groups. This discrepancy is probably due to the fact that, in their FR30 model, pups from undernourished mothers were cross-fostered onto dams that had been fed ad libitum. This marked difference between both models emphasizes the importance of normal lactation and catch-up growth during early lactation of undernourished pups (10, 26, 53).

In our model, contrary to the Barker hypothesis, impaired glucose tolerance was not caused by insulin resistance but, at least in part, by decreased insulin secretion. These findings are consistent with data demonstrating that the effect of maternal undernutrition on offspring blood glucose and insulin levels largely depends on the species, as well as the protocols, used. Thus the different outcome of maternal FR30 for regulation of glycemia in offspring may reflect fetal and/or postnatal programming differences, such as the timing of sensitive developmental windows, the nature of the malnutrition, or the genetic background of the species (29, 43).

Finally, FR30 rats exhibited dysregulated day-night food intake rhythm. In rats, recent studies reported that prenatal maternal feeding modifications may program the biological clock and circadian rhythm of the offspring (34). In addition, exposure of the fetal developing brain to an excess of circulating glucocorticoids, which occurred during gestation in undernourished FR30 dams, might result in resetting of circadian rhythms of the HPA axis in the offspring (31). These factors might, at least in part, account for impaired central circadian clock activity and sleep-arousal balance perturbation in FR30 rats. This hypothesis is supported by additional observations. On the one hand, at rest, the morning increase in plasma insulin level observed in FR30 rats might reflect postprandial insulinemia as a result of modified light-dark food intake rhythm. Feeding and increased insulin levels induce c-Fos expression in POMC neurons (48). Accordingly, in the morning, FR30 rats exhibited a striking increase in the number of c-Fos-containing cells in the ventral part of the Arc. About 30% of the c-Fos-expressing cells were POMC neurons. On the other hand, during the dark period of the cycle, the ventromedial Arc spontaneously exhibited increased c-Fos immunoreactivity, whereas very low c-Fos labeling was detectable during the light period. This nocturnal induction occurred at the nuclear level of POMC-producing neurons (24). Thus activation of the Arc melanocortin-signaling system might contribute to the termination of food intake and satiety, a period that might be delayed in FR30 rats (24, 48).

In conclusion, we have demonstrated that maternal undernutrition differently programs the long-term appetite-regulatory system in their offspring, especially the response of POMC neurons to energy status and food intake rhythm.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank V. Montel and A. Dickès-Coopman for technical assistance.

GRANTS

This study was supported by grants from the French Ministry of Education and grants from the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais.

REFERENCES

- Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* 140: 4923–4931, 1999.
- Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity. *Neuropeptides* 40: 375–401, 2006.
- Attig L, Solomon G, Ferezou J, Abdennebi-Najar L, Taouis M, Gertler A, Djiane J. Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes* 32: 1153–1160, 2008.
- Barker DJ. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr* 93: 26–33, 2004.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304: 108–110, 2004.
- Breton C, Pechoux C, Morel G, Zingg HH. Oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization, regulation, and cellular localization in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 136: 2928–2936, 1995.
- Chen K, Li F, Li J, Cai H, Strom S, Bisello A, Kelley DE, Friedman-Einat M, Skibinski GA, McCrory MA, Szalai AJ, Zhao AZ. Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nat Med* 12: 425–432, 2006.
- Chrousos GP. Stressors: stress and neuroendocrine integration of the adaptive response. *Ann NY Acad Sci* 851: 311–335, 1998.
- Cottrell EC, Ozanne SE. Developmental programming of energy balance and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc* 66: 198–206, 2007.
- Cripps RL, Archer ZA, Mercer JG, Ozanne SE. Early life programming of energy balance. *Biochem Soc Trans* 35: 1203–1205, 2007.
- Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 149: 470–475, 2008.
- de Moura EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep* 25: 251–269, 2005.
- Desai M, Gayle D, Han G, Ross MG. Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod Sci* 14: 329–337, 2007.
- Dutriez-Casteloot I, Breton C, Coupe B, Hawchar O, Enache M, Dickes-Coopman A, de Keyzer Y, Deloof S, Lesage J, Vieau D. Tissue-specific programming expression of glucocorticoid receptors and 11 β -HSDs by maternal perinatal undernutrition in the HPA axis of adult male rats. *Horm Metab Res* 40: 1–5, 2008.
- Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjørbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775–786, 1999.
- Engelbregt MJT, van Weissenbruch MM, Lips P, van Lingem A, Roos JC, Delemarre-van de Waal HA. Body composition and bone measurements in intra-uterine growth-retarded and early postnatally undernourished male and female rats at the age of 6 months: comparison with puberty. *Bone* 34: 180–186, 2004.
- Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 88: 234–243, 2006.
- Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG, Bateson P. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proc Biol Sci* 272: 671–677, 2005.
- Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 138: 3859–3863, 1997.
- Hoet JJ, Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol* 514: 617–627, 1999.
- Houdijk ECAM, Engelbregt MJT, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Endocrine regulation and extended follow-up of longitudinal growth in intrauterine growth-retarded rats. *J Endocrinol* 166: 599–608, 2000.
- Ikenasio-Thorpe BA, Breier BH, Vickers MH, Fraser MH. Prenatal influences on susceptibility to diet-induced obesity are mediated by altered neuroendocrine gene expression. *J Endocrinol* 193: 31–37, 2007.
- Jaferi A, Bhatnagar S. Corticosterone can act at the posterior paraventricular thalamus to inhibit hypothalamic-pituitary-adrenal activity in an-

- imals that habituate to repeated stress. *Endocrinology* 147: 4917–4930, 2006.
24. **Jamali AK, Tramu G.** Daily cycle of fos expression within hypothalamic POMC neurons of the male rat. *Brain Res* 771: 45–54, 1997.
 25. **Kind KL, Roberts CT, Sohlstrom AI, Katsman A, Clifton PM, Robinson JS, Owens JA.** Chronic maternal feed restriction impairs growth but increases adiposity of the fetal guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R119–R126, 2005.
 26. **Krechowec SO, Vickers MH, Gertler A, Breier BH.** Prenatal influence on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *J Endocrinol* 189: 355–363, 2006.
 27. **Ladyman SR.** Leptin resistance during pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol* 20: 269–277, 2008.
 28. **Lesage J, Sebaai N, Léonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, Vieau D.** Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 9: 183–198, 2006.
 29. **Levin BE.** Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1107–1121, 2006.
 30. **Lopez M, Seoane LM, Tovar S, Garcia MC, Nogueiras R, Dieguez C, Senaris RM.** A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia* 48: 140–148, 2005.
 31. **Maccari S, Morley-Fletcher S.** Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology* 32: S10–S15, 2007.
 32. **MohanKumar SM, King A, Shin AC, Sirivelu MP, MohanKumar PS, Fink GD.** Developmental programming of cardiovascular disorders: focus on hypertension. *Rev Endocr Metab Disord* 8: 115–125, 2007.
 33. **Myers MG, Cowley MA, Münzberg H.** Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70: 537–556, 2008.
 34. **Ohta H, Xu S, Moriya T, Iigo M, Watanabe T, Nakahata N, Chisaka H, Hanita T, Matsuda T, Ohura T, Kimura Y, Yaegashi N, Tsuchiya S, Tei H, Okamura K.** Maternal feeding controls fetal biological clock. *PLoS ONE* 3: e2601, 2008.
 35. **Plagemann A, Harder T, Melchior K, Rake A, Rohde W, Dörner G.** Elevation of hypothalamic neuropeptide Y neurons in adult offspring of diabetic mother rats. *Neuroreport* 10: 3211–3216, 1999.
 36. **Plagemann A, Harder T, Rake A, Janert U, Melchior K, Rohde W, Dörner G.** Morphological alterations of hypothalamic nuclei due to intrahypothalamic hyperinsulinism in newborn rats. *Int J Dev Neurosci* 17: 37–44, 1999.
 37. **Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Rohde W, Dörner G.** Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr* 130: 2582–2589, 2000.
 38. **Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T, Rohde W, Dörner G.** Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y system in neonatally overfed weanling rats. *J Neuroendocrinol* 11: 541–546, 1999.
 39. **Plagemann A, Waas T, Harder T, Rittel F, Ziska T, Rohde W.** Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Neuropeptides* 34: 1–6, 2000.
 40. **Rajakumar PA, He J, Simmons RA, Devaskar SU.** Effects of uteroplacental insufficiency upon brain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression and concentrations. *Pediatr Res* 44: 168–174, 1998.
 41. **Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP.** Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 70: 811–816, 1999.
 42. **Remmers F, Verhagen LA, Adan RA, Delemarre-van de Waal HA.** Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. *Endocrinology* 149: 3617–3625, 2008.
 43. **Reusens B, Ozanne SE, Remacle C.** Fetal determinants of type 2 diabetes. *Curr Drug Target* 8: 935–941, 2007.
 44. **Rivière G, Michaud A, Breton C, VanCamp G, Laborie C, Enache M, Lesage J, Deloof S, Corvol P, Vieau D.** Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension* 46: 1169–1174, 2005.
 45. **Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H.** Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16: 623–637, 2002.
 46. **Sebaai N, Lesage J, Breton C, Vieau D, Deloof S.** Perinatal food deprivation induces marked alterations of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in 8-mo-old male rats both under basal conditions and after a dehydration period. *Neuroendocrinology* 79: 163–173, 2004.
 47. **Seckl JR.** Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 151: U49–U62, 2004.
 48. **Singru PS, Sanchez E, Fekete C, Lechan RM.** Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety. *Endocrinology* 148: 638–646, 2007.
 49. **Smart JL, Tolle V, Oteron-Corchon V, Low MJ.** Central dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *Endocrinology* 148: 647–659, 2007.
 50. **Taylor PD, Poston L.** Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol* 92: 287–298, 2007.
 51. **Thompson NM, Norman AM, Donkin SS, Shankar RR, Vickers MH, Miles JL, Breier BH.** Prenatal and postnatal pathways to obesity: different underlying mechanisms, different metabolic outcomes. *Endocrinology* 148: 2345–2354, 2007.
 52. **van Dijk G, de Vries K, Nyakas C, Buwalda B, Adage T, Kuipers F, Kas MJH, Adan RAH, Wilkinson CW, Thiele TE, Scheurink AJW.** Reduced anorexigenic efficacy of leptin, but not of the melanocortin receptor agonist melanotan-II, predicts diet-induced obesity in rats. *Endocrinology* 146: 5247–5256, 2005.
 53. **Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD.** Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E83–E87, 2000.
 54. **Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M.** Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 146: 4211–4216, 2005.
 55. **Vickers MH, Ikenasio-Thorpe BA, Breier BH.** Adult growth hormone treatment reduces hypertension and obesity by an adverse prenatal environment. *J Endocrinol* 175: 615–623, 2002.
 56. **Vuguin PM.** Animal model for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm Res* 68: 113–123, 2007.
 57. **Yu IC, Lin HY, Liu NC, Wang RS, Sparks JD, Yeh SY, Chang C.** Hyperleptinemia without obesity in male mice lacking androgen receptor in adipose tissue. *Endocrinology* 149: 2361–2368, 2008.

Malgré une glycémie comparable, les animaux FR30 présentent une intolérance au glucose modérée résultant, en partie, d'une diminution de la sécrétion d'insuline. En condition basale, ils montrent une hyperinsulinémie, une hyperleptinémie sans phénotype d'obésité, pouvant refléter un état de résistance à la leptine et un taux circulant élevée de corticostérone. En réponse au jeûne, les taux plasmatiques de leptine et d'insuline sont fortement diminués dans les deux groupes expérimentaux. De manière surprenante, l'hypercorticostéronémie présente chez les contrôles n'est pas observée chez les animaux FR30.

En condition basale, les animaux FR30 présentent une diminution de l'expression du récepteur à la leptine, une augmentation du récepteur à l'insuline mais aucune variation de l'expression du NPY et de la POMC dans l'hypothalamus. Après un jeûne, les animaux FR30 montrent un profil d'expression différentiel des facteurs orexigènes et anorexigènes hypothalamiques comparés aux animaux T.

La partie ventrale du NA incluant les neurones à POMC montre un marquage c-fos différentiel entre les animaux contrôles et FR30 en condition basale et après un jeûne. Les projections des neurones à POMC au niveau des noyaux dorsomédians et paraventriculaires, entre autres, sont similaires dans les deux groupes en condition basale. Cependant, elles sont plus abondantes après un jeûne chez les animaux FR30 comparés aux animaux T.

Les animaux FR30 mangent la même quantité de nourriture que les T sur 24 heures mais présentent un rythme de prise alimentaire décalé en phase diurne. De plus, après un jeûne, la cinétique de la reprise alimentaire est différente chez ces animaux.

L'ensemble de ces résultats indique que les rats FR30 présentent une réponse adaptative au jeûne et une possible perturbation du rythme circadien de la prise alimentaire.

La DM prénatale programme donc à long terme la régulation de la prise alimentaire chez la descendance mâle et altère, en particulier, l'activité des neurones à POMC qui semblent être une cible privilégiée de la programmation fœtale.

**Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue
gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet**

Lukaszewski M.A., Mayeur S., Fajardy I., Delahaye F., Dutriez-Casteloot I.,
Montel V., Dickes-Coopman A., Laborie C., Lesage J., Vieau D., Breton C

American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism

Notre première étude a permis de montrer que les rats FR30 présentent des altérations de la régulation du métabolisme énergétique et des neurones hypothalamiques à POMC. Nous avons tout particulièrement montré une augmentation de la concentration de leptine et de corticostérone plasmatiques, deux hormones impliquées dans la régulation de l'axe hypothalamo-adipocytaire (pour revue Ahima *et al.*, 2006). L'hyperleptinémie circulante, la surexpression du gène codant la leptine dans le TA et l'hypercorticostéronémie connues pour moduler l'activité du TA, suggéraient que ce tissu puisse être également une cible privilégiée de la DM chez la descendance FR30 adulte. En parallèle, appuyant ces observations, il a été montré au laboratoire que la DM périnatale programme l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et induit un phénotype équivalent à celui du tissu adipeux brun dans le TA périgonadique chez la descendance mâle au sevrage (Delahaye *et al.*, 2010).

Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle la DM prénatale programmerait des perturbations de l'activité du TA blanc et de son expression génique ce qui pourrait jouer un rôle clé dans dérégulation de la balance énergétique à long terme.

Afin de tenter d'accentuer les altérations métaboliques déjà présentes dans notre modèle, nous avons soumis les rats à un régime HF dès le sevrage. Après avoir déterminé les paramètres métaboliques du modèle FR30HF, nous avons, en particulier, réalisé des analyses transcriptomiques sur l'hypothalamus et le TA à l'aide de RT-PCR array quantitatif contenant 84 gènes dédiés à l'obésité. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à deux dépôts différents de TA : le TA périgonadique et périrénal, dans lesquels nous avons analysé l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'adipogenèse, de la lipogenèse, et de la sensibilité aux glucocorticoïdes. Nous avons également évalué la phosphorylation de STAT3, reflétant la sensibilité à la leptine, dans ces dépôts.

Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet

Marie-Amélie Lukaszewski, Sylvain Mayeur, Isabelle Fajardy, Fabien Delahaye, Isabelle Dutriez-Casteloot, Valérie Montel, Anne Dickes-Coopman, Christine Laborie, Jean Lesage, Didier Vieau, and Christophe Breton

Unité Environnement Périnatal et Croissance, UPRES EA 4489, Université Lille-Nord de France, Equipe Dénutritions Maternelles Périnatales, Villeneuve d'Ascq, France

Submitted 7 January 2011; accepted in final form 25 May 2011

Lukaszewski MA, Mayeur S, Fajardy I, Delahaye F, Dutriez-Casteloot I, Montel V, Dickes-Coopman A, Laborie C, Lesage J, Vieau D, Breton C. Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E548–E559, 2011. First published June 28, 2011; doi:10.1152/ajpendo.00011.2011.—Several studies have shown that maternal undernutrition leading to low birth weight predisposes offspring to the development of metabolic pathologies such as obesity. Using a model of prenatal maternal 70% food restriction diet (FR30) in rat, we evaluated whether postweaning high-fat (HF) diet would amplify the phenotype observed under standard diet. We investigated biological parameters as well as gene expression profile focusing on white adipose tissues (WAT) of adult offspring. FR30 procedure does not worsen the metabolic syndrome features induced by HF diet. However, FR30HF rats displayed catch-up growth to match the body weight of adult control HF animals, suggesting an increase of adiposity while showing hyperleptinemia and a blunted increase of corticosterone. Using quantitative RT-PCR array, we demonstrated that FR30HF rats exhibited leptin and Ob-Rb as well as many peptide precursor and receptor gene expression variations in WAT. We also showed that the expression of genes involved in adipogenesis was modified in FR30HF animals in a depot-specific manner. We observed an opposite variation of STAT3 phosphorylation levels, suggesting that leptin sensitivity is modified in WAT adult FR30 offspring. We demonstrated that 11 β -HSD1, 11 β -HSD2, GR, and MR genes are coexpressed in WAT and that FR30 procedure modifies gene expression levels, especially under HF diet. In particular, level variation of 11 β -HSD2, whose protein expression was detected by Western blotting, may represent a novel mechanism that may affect WAT glucocorticoid sensitivity. Data suggest that maternal undernutrition differently programs the adult offspring WAT gene expression profile that may predispose for altered fat deposition.

maternal undernutrition

INCREASING EVIDENCE SUGGESTS that the origin of some metabolic disorders, which manifest in adult life, may have their roots during development. Indeed, epidemiological studies have shown that adverse environmental factors leading to intrauterine growth retardation (IUGR) and low birth weight may predispose individuals to the later onset of energy balance metabolic development of pathologies (11, 22). This led to the concept of developmental origin of health and diseases (DOHaD), also called “fetal programming” (2, 54). Thus, adult individuals whose mothers were undernourished early in pregnancy displayed higher rates of intra-abdominal adiposity associated

with increased risk of metabolic pathologies (9, 50). Inappropriate early postnatal nutrition, and more specifically rapid catch-up growth, may significantly heighten energy balance dysfunctions in adulthood. In particular, postnatal hypercaloric nutrition is an important accelerator in the etiology of adult-onset disease in human born with low birth weight (29).

To understand the underlying mechanisms, numerous animal models have been developed to promote intrauterine fetal programming, including maternal undernutrition (56). These studies confirmed that impaired fetal development has common long-term metabolic consequences sensitizing the offspring to metabolic syndrome features, particularly when nourished with a hypercaloric diet (19, 52, 57). In rodents, numerous data have demonstrated that fetal or neonate hypothalamus is a main target of perinatal modifications of energy status (8, 12, 17, 25, 48, 51). In particular, leptin was found to act as a neurotropic factor promoting neuronal outgrowth during postnatal brain development and is thus highly involved in the plasticity and hardwiring the hypothalamic appetite-regulatory circuits (7, 15, 25).

Adipogenesis occurs primarily during late fetal and early postnatal life. Perturbations to the fetal nutrient supply affect adipocyte development, leading to persistent alterations in their functional properties (42). In humans, IUGR affects the relative abundance and deposition of adipose tissue in a depot-specific manner. Indeed, the differences in fat and lean mass proportions observed are thought to play a crucial part in defining a propensity for accumulating body fat later in life. An important concept is that IUGR adipose tissue appears dysregulated before the onset of obesity (9, 30).

The mature adipocyte is not just a place for storing energy as fat but is also an endocrine cell, secreting cytokines and hormones associated with the control of energy balance (60). Indeed, many appetite-regulating related peptides or receptors are expressed in human and rodent white adipose tissue (WAT), acting in an autocrine/paracrine manner to regulate adipocyte lipid metabolism and as endocrine signals to regulate energy homeostasis (14, 27, 62, 63). In particular, leptin, via its long form receptor (Ob-Rb), was found to prevent adipocyte hypertrophy and hyperplasia and body fat increment induced by high-fat (HF) diet by increasing fatty acid oxidation and decreasing lipogenic pathways (28, 31, 55, 61).

Several studies have investigated the consequences of perinatal nutritional manipulations on adult rat offspring WAT, but only under standard diet. Maternal protein restriction did not affect the capacity of preadipocytes to divide or store fat in fetuses, neonates, and weaning offspring (3). However, growth-restricted adult male rat offspring exhibited increased

Address for reprint requests and other correspondence: C. Breton, Unité Environnement Périnatal et Croissance, UPRES EA 4489, Université Lille-Nord de France, Equipe Dénutritions Maternelles Périnatales, Villeneuve d'Ascq, France (e-mail: christophe.breton@univ-lille1.fr).

rates of preadipocyte proliferation, whereas it did not affect the preadipocyte differentiation (65). Maternal protein restriction modified WAT fat-synthesizing enzymes' gene expression in adult male rat offspring (4, 24, 26). In addition, rat offspring adipocytes displayed an age-dependent loss of insulin sensitivity in a depot-specific manner associated with modification of the expression of key components of the insulin pathway (46). Maternal 50% food restriction from 10 days to term gestation leads to adult intrauterine growth-restricted male rats that exhibited programmed upregulation of adipogenic transcription factor (18). Uteroplacental insufficiency-induced IUGR increases visceral adiposity and proadipogenic factor in male rat offspring (32). We (16) recently demonstrated that maternal perinatal undernutrition delays the maturation of gonadal WAT. We also showed that numerous genes involved in energy metabolism regulation are expressed in rat neonate gonadal WAT and are sensitive to maternal perinatal undernutrition.

Using a model of prenatal maternal 70% food restriction diet (FR30) in pregnant female rats throughout gestation, we have previously shown that the FR30 procedure induces IUGR and programs some metabolic syndrome features in adult male rat offspring (52). Although showing a lean phenotype, adult FR30 rats were predisposed to adiposity and showed subtle food intake and hypothalamic appetite programming system alterations (8). They also exhibited higher concentrations of serum leptin and corticosterone, two hormones actively involved in hypothalamus-adipose tissue axis regulation (1, 43) and body fat accumulation (38, 64). We decided to assess whether a postweaning HF diet would amplify the phenotype. For that purpose, we investigated body weight gain, adiposity, endocrine and metabolic parameters, and gene expression profile focusing on the adipose tissue programmed mechanisms. Our data demonstrate that adult male rat offspring subjected to maternal prenatal undernutrition (MPU) exhibited a long-term impact on the gene expression in adipose tissue that might predispose them to increased adiposity when challenged with a HF diet.

MATERIALS AND METHODS

Animals. As previously described (8), Wistar rats were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and housed six per cage. After mating with a male, pregnant females were transferred into individual cages with free access to water and to standard rat chow (SAFE 04, 2,900 cal/g, containing 16% protein, 3% fat, 60% carbohydrates; UAR, Augy, France). Control pregnant dams were fed ad libitum, while pregnant dams from the feed-restricted group fed 30% (FR30) of the daily intake of control pregnant dams, from day 1 (E1) of pregnancy until delivery (E21). At parturition, litter size was adjusted to eight pups per dam. Feed-restricted pups were nursed by FR30 dams fed ad libitum during lactation. To obviate any litter effects, animals used for each experiment were randomly chosen in different litters, and only a limited number of animals ($n = 1$ or 2) were used from each litter. After weaning, male offspring from the control (C) or FR30 dams were housed individually and divided into four groups (CN, CHF, FR30N, FR30HF; $n = 16$ per group) to be fed either standard (N) or high-fat (HF) (SAFE, D12451, 4,720 cal/g, containing 23% protein, 23% fat, 40% carbohydrates; UAR, Augy, France). Body weight and food intake of the offspring were measured weekly until adulthood. All parameters of adult male offspring were studied at 4 mo of age. Animal use accreditation by the French Ministry of Agriculture (No. 04860) has been granted to our labora-

tory for experimentation with rats. Experiments were conducted in accordance with the principles of laboratory animal care (European Communities Council Directive of 1986, 86/609/EEC).

Plasma and tissue collections. At 4 mo of age, male rats were rapidly weighed and killed by decapitation between 9 and 10 AM. Trunk blood samples were collected into prechilled tubes containing EDTA (20 μ l of a 5% solution), gently shaken, and centrifuged at 4,000 g for 10 min at 4°C. Aliquots of the supernatants were stored at -20°C until assayed. Hypothalami as well as deposit pads of WAT and interscapular brown adipose tissue (BAT) were rapidly removed, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use. For histology experiments, animals were fixed by intracardiac perfusion using buffered 4% paraformaldehyde solution.

Food intake and metabolic parameters. Food consumption was recorded weekly from weaning [postnatal day (PND)22] to adulthood (PND120) in the four groups. Food intake of rats was measured once a day at the beginning of the light phase (9 AM). All animals were presented with the same amount of food, and their intake was measured by subtracting the uneaten food.

For oral glucose tolerance tests (OGTT), rats were fasted overnight (16 h). Basal blood glucose level, defined as T0, was determined using an automatic glucometer (Glucotrend 2; Roche Diagnostics, France) before the glucose administration (2 g/kg body wt; $n = 12$ per group). Tail vein blood glucose was then measured at 0, 15, 30, 60, and 120 min after administration. Plasma insulin concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (DRG International).

Endocrine parameters. All plasma endocrine parameters levels were investigated with commercially available kits. Blood glucose and plasma insulin levels were determined as described above. Plasma leptin and adiponectin concentrations were measured with murine enzyme-linked immunosorbent assay kits (Diagnostic Systems Laboratories; Adipogen, Korea), respectively. Plasma corticosterone levels were determined by a competitive enzyme immunoassay (Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK). Assay kits were applied to determine the contents of plasma triglycerides and total cholesterol (61238 Triglyceride Enzymatique PAPI00, 61218 Cholesterol Liquide; Bio-Mérieux, France) as well as free cholesterol and free fatty acid (FFA) (ref. nos. 279-47106 and 999-75406; Wako Chemicals, Neuss, Germany). Each point was measured in duplicate. The assay sensitivities were 0.07 ng/ml (insulin), 0.04 ng/ml (leptin), 0.1 ng/ml (adiponectin), and 0.55 ng/ml (corticosterone), and the intra- and interassay coefficients of variation were 4 and 9.1% (insulin), 5.4 and 7.3% (leptin), 4.4 and 6.1% (adiponectin), and 4.9 and 7.8% (corticosterone), respectively.

Gene expression analysis. Hypothalamic and gonadal WAT gene expressions were determined in the four groups using RT-qPCR as validated previously (16). RT-qPCR assays were performed using the Rat Obesity RT2 Profiler PCR Array (SuperArray Bioscience, Frederick, MD, <http://www.superarray.com>) on a Roche Lightcycler 380. PCR arrays allowed us to simultaneously investigate gene expression variation of 84 genes known to be implicated in obesity (<http://www.superarray.com/pcr/arrayanalysis.php>). Briefly, RNA was extracted and purified from hypothalami using the TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies, France) and gonadal WAT animals using RNeasy lipid tissue minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturers' recommendations. The quality of total RNA was assessed by determining the 260/280 and the 260/230 absorbance ratios and by agarose gel electrophoresis. An equal amount of total RNA (in μ g) isolated from a particular tissue was pooled for each treatment group ($n = 5$ animals/group). First-strand cDNAs were generated using an RT² First Strand Kit (Cat. no. C-03, SuperArray). For RT-qPCR, first-strand cDNAs were added to the RT qPCR Master Mix (SuperArray Bioscience). Samples were heated for 10 min at 95°C and then subjected to 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing and elongation at 60°C for 1 min. Relative expression values between animal groups were determined by the following rule: for each sample, we calculated difference

between the C_T (ΔC_T) values for the gene of interest and housekeeping genes (HPRT, LDHA, actin B and RPL13a, respectively). Finally, the fold change of interrogated gene expression in each tissue was calculated as fold change = $2^{-\Delta\Delta C_T}$. The results are expressed as scatter plots, and only genes whose mRNA levels changed more than twofold in either direction (up- and downregulation) were selected.

RT-qPCR on individual samples ($n = 5$) was performed to confirm the results obtained using the PCR array approach. These samples were different from those that were used for PCR arrays. In addition, RT-qPCR was also used to investigate the expression profile of representative genes in two fat pads (gonadal and perirenal WAT). Primer sequences are presented in Table 1. Relative expression levels of RNA per sample were quantified by SYBR Green I assay on a Roche Light Cycler 480 sequence detection assay (Meylan, France). For each transcript, PCR was performed in duplicate with 10 μ l of final reaction volumes with 1 μ l of cDNA, 8 μ l of mix, and 0.5 μ l of each primer set (Table 1). PCR was conducted using the following cycle parameters: 10 min at 95°C, and 40 three-step cycles of 15 s at 95°C, 20 s at 60°C, and 30 s at 72°C. The assay was performed following the manufacturer's recommendations. A pool of cDNA from control tissues was used as a standard (in threefold serial dilutions) for quantitative correction. All cDNA samples were applied

in dilution of 1:10 to obtain results within the range of the standard. Each sample was evaluated in duplicate. Analysis of transcript level was carried out using first the determination of the threshold cycle C_T for each reaction corrected by the efficiency. Then the ΔC_T was calculated by subtracting the mean C_T of the calibrator from each value of C_T for each gene. The amount of target relative to a calibrator was computed by $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Adipose tissue histology. Gonadal WAT from the four groups ($n = 6$ per group) was postfixed for 24 h in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), cryoprotected by incubation for 24 h in 0.05 M PBS containing 20% sucrose, and frozen in liquid nitrogen. Gonadal WAT was then cut into serial 10- μ m sections on a cryostat, mounted on gelatine-coated slides, and stained with hematoxylin of Groat and phloxin (2%), according to standard laboratory protocols. Sections were examined using light microscopy (Leica DM IRE2), and photomicrographs were captured at $\times 20$ magnification.

Western blot analysis. Frozen perirenal or gonadal WAT from the four groups ($n = 5$ per group) was homogenized in lysis buffer: 250 mM sucrose, 10 mM HEPES-Tris, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), pepstatin A, E-64, bestatin, leupeptin, and aprotinin, and phosphatase inhibitor cocktail (10 mM sodium fluoride, 1 mM sodium

Table 1. Primers used for RT-qPCR analysis

Target	Sequence (Primer 3 Design)	NCBI Detected Transcript No.	Length of Amplicon
Leptin			
Forward	5'-GTTCTGTGGCTTTGGTCCT-3'	NM_013076	99 bp
Reverse	5'-CTGGTGACAATGGTCTTGATGA-3'		
Ob-Rb			
Forward	5'-GCATGCAGAATCAGTGATATTTGG-3'	NM_012596	81 bp
Reverse	5'-CAAGCTGTATGGACACTGATTTCTTC-3'		
Adiponectin			
Forward	5'-CAGGAGATGCTGGAATGACA-3'	NM_144744	114 bp
Reverse	5'-CTACGCTGAATGCTGAGTGAT-3'		
ACC			
Forward	5'-TCCCGGAGCTACTCTTAAAAAATG-3'	NM_022193	71 bp
Reverse	5'-CCCCAACGCCACATG-3'		
FAS			
Forward	5'-GGACATGGTCACAGACGATGAC-3'	NM_017332	94 bp
Reverse	5'-GTCGAACTTGGACAGATCCTTCA-3'		
C/EBP α			
Forward	5'-AGTTGACCAGTGACAATGACCG-3'	NM_012524	94 bp
Reverse	5'-TCAGGCAGCTGGCGGAAGAT-3'		
PPAR γ			
Forward	5'-TTGGCCATATTTATAGTGTTCATTATT-3'	NM_001138838	76 bp
Reverse	5'-TGTCTCGATGGGCTTCA-3'		
PREF-1			
Forward	5'-CAATGGTTCTCCCTGCCAG-3'	NM_053744	119 bp
Reverse	5'-TGTTGGTCACGATCTCACAGAA-3'		
SREBP-1c/ADD1			
Forward	5'-CATCGACTACATCCGCTTCTTACA-3'	NC_005109	97 bp
Reverse	5'-GTCTTTTCAGTGATTTTGCTTTTGTGA-3'		
GR			
Forward	5'-GTGAAATGGGCAAAGGCGATAC-3'	NM_012576	98 bp
Reverse	5'-GCAAAATGCCATGAGAAACATCC-3'		
MR			
Forward	5'-CTGTGCCCGGCTTTGATGGTAG-3'	NM_013131	100 bp
Reverse	5'-GGGATGCTGGCTTCAGGGTAAT-3'		
11 β -HSD1			
Forward	5'-GGACTGGACATGCTCATTCTCA-3'	NM_017080	84 bp
Reverse	5'-GCTTCTTCGCACAGAGTGGATA-3'		
11 β -HSD2			
Forward	5'-ATGTGAACCTCTGGGAGAAGCG-3'	NM_012524	100 bp
Reverse	5'-CCATGCAAGTGTCAATGTAGTC-3'		
Housekeeping gene Ldha (LDH A)			
Forward	5'-ATCCCATTCCACCATGATTAA-3'	NM_017025	122 bp
Reverse	5'-GTCAGGAGTCAGTGTACCTTC-3'		

See text for definitions. Accession numbers, primer positions, and size of PCR products are indicated. Accession numbers correspond to the mRNA sequences.

Table 2. Effects of maternal undernutrition (FR30) on birth weight and morphometric and biological parameters of adult rats under standard (N) or high-fat (HF) diet

	CN	CHF	FR30N	FR30HF
Birth weight, g	6.29 ± 0.11		4.45 ± 0.13***	
Adult body weight, g	471 ± 31	529 ± 54+++	451 ± 40	518 ± 39+++
Liver, g	11.88 ± 1.75	12.76 ± 1.35	11.68 ± 1.02	11.92 ± 1.23
Perirenal WAT, g	9.97 ± 3.44	24.94 ± 10.11+++	10.95 ± 3.98	22.47 ± 4.62+++
Epididymal WAT, g	10.66 ± 4.23	21.19 ± 6.63+++	11.55 ± 4.11	20.06 ± 3.53+++
Subcutaneous WAT, g	0.59 ± 0.17	0.85 ± 0.41+	0.59 ± 0.32	1.09 ± 0.59+++
Interscapular BAT, g	0.33 ± 0.13	0.50 ± 0.23+	0.26 ± 0.10	0.33 ± 0.16*
Triglycerides, mg/dl	203.23 ± 3.78	203.62 ± 9.40	182.07 ± 14.7	183.79 ± 12.75
Total cholesterol, mg/dl	68.61 ± 19.51	109.02 ± 4.97+++	65.17 ± 2.57	102.27 ± 4.73+++
Free fatty acid, mmol/l	0.91 ± 0.06	0.69 ± 0.05+	0.87 ± 0.04	0.61 ± 0.06+
Glucose, g/l	1.31 ± 0.22	1.46 ± 0.25+	1.26 ± 0.28	1.37 ± 0.23+
Insulin, µg/l	1.75 ± 0.18	2.91 ± 0.18+	1.64 ± 0.20	2.59 ± 0.34+
Leptin, ng/ml	0.33 ± 0.04	0.915 ± 0.12+++	0.71 ± 0.13**	1.86 ± 0.18***,+++
Adiponectin, ng/ml	13.95 ± 0.61	15.09 ± 0.60	15.03 ± 0.8	17.74 ± 0.89*
Corticosterone, µg/dl	4.31 ± 0.99	14.39 ± 2.62+++	10.8 ± 2.33*	11.42 ± 1.97

Values are means ± SE ($n = 16$ rats per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$: FR30 vs. C in the same condition. + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$: HF diet vs. N diet.

orthovanadate, 20 mM sodium β -glycerophosphate, and 10 mM benzamidine). After lysis in ice, insoluble materials were removed by centrifugation (10,000 rpm at 4°C for 10 min and then 15,000 rpm at 4°C for 10 min), and protein concentrations of the resulting lysates were determined using a protein assay kit (Bio-Rad, France). Proteins were diluted in Laemmli buffer, denatured, and subjected to 8% SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Blots were blocked with 5% albumin bovine serum (Sigma, France) and then incubated in the presence of appropriate primary antibodies (anti-phosphorylated STAT3 or anti-total STAT3; Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France, respectively) or with a sheep anti-rat 11 β -HSD2 polyclonal antibody (Chemicon International, Temecula, CA) and secondary antibodies. A mouse anti-rat α -tubulin antibody (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was used as a loading control. Following nitrocellulose membrane washing, targeted proteins (~85 kDa for STAT3, 40 kDa for 11 β -HSD2, and 50 kDa for α -tubulin) were revealed using enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Life Science, Les Ulis, France) according to the manufacturer's recommendations. The intensity of bands was quantified by using Quantity One Bio-Rad and the p-STAT3/t-STAT3 ratios were calculated.

Statistical analysis. All data are presented as means ± SE. Statistical analysis was performed by analysis of variance (two-way ANOVA with prenatal undernutrition and diet as factors) followed by Neuman Keuls post hoc analysis. A P level of <0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using Sigma-Stat software (Systat Software, Port Richmond, CA).

RESULTS

Effects of HF on body composition. The body weights of male newborn pups differed between the C and FR30 groups by ~30% (6.29 ± 0.11 vs. 4.45 ± 0.13 g, $P < 0.001$). From birth until 4 mo, FR30 rats' body weight remained lower (Table 2). HF diet during postnatal life resulted in significantly increased body weights compared with standard diet-fed animals in both groups (C, 529 ± 54 vs. 471 ± 31 g; FR30, 518 ± 39 vs. 451 ± 40 g, respectively; $P < 0.001$; Table 2). By P71, FR30 rats fed hypercalorically showed apparent catch-up growth to match the body weight of C animals fed the HF diet (Fig. 1). In line with this, at P64 and P71, FR30HF rats were hyperphagic, exhibiting a transient, significantly increased weight-related caloric intake calculated as energy in food ingested (cal/g of animal) compared with C rats. However, this

increased weight-related caloric consumption was no longer apparent in 4-mo-old FR30 rats. Indeed, in both FR30 and C groups, adult males fed the HF diet exhibited similar weight-related increased daily energy intake leading to fat increment (data not shown).

The absolute weight of the liver showed no difference between groups. As expected, both CHF and FR30HF groups had increased perirenal (C, 24.94 ± 10.11 vs. 9.97 ± 3.44 g; FR30, 22.47 ± 4.62 vs. 10.95 ± 3.98 g, respectively; $P < 0.001$), epididymal (C, 21.19 ± 6.63 vs. 10.66 ± 4.23 g; FR30, 20.06 ± 3.53 vs. 11.55 ± 4.11 g, respectively; $P < 0.001$), and subcutaneous fat deposits (C, 0.85 ± 0.41 vs. 0.59 ± 0.17 g; FR30, 1.09 ± 0.59 vs. 0.59 ± 0.32 g, respectively; $P < 0.001$) compared with standard diet (Table 2). In this study, we observed no significant difference of absolute fat pad weights between C and FR30 animals in the same dietary group (standard or HF diet). However, as reported earlier (8), when expressed relative to body weight, FR30 animals exhibited a tendency toward greater body fat content in both regimens compared with C rats.

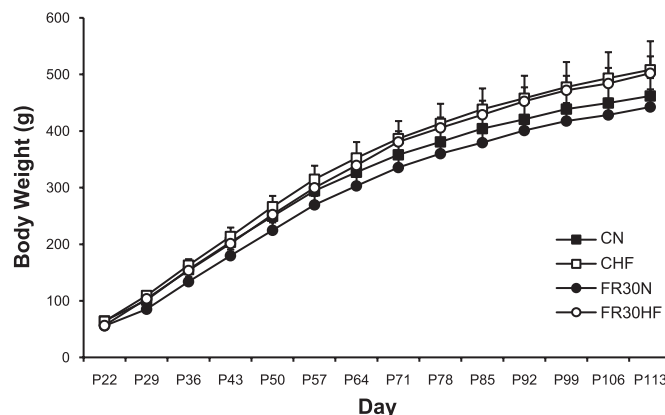


Fig. 1. Postnatal growth curves of 70% food restriction diet (FR30) and control (C) offspring fed either standard diet (N) (CN ■, FR30N ●) or high-fat (HF) (CHF □, FR30HF ○) diet postweaning. Note that by postnatal day (P)71, FR30 rats fed hypercalorically showed apparent catch-up growth to match the body weight of CHF animals ($n = 16$ per group).

Effects of HF on plasma parameters and glucose tolerance. As shown in Table 2, plasma triglyceride contents were not significantly different between C and FR30 adult offspring rats and were not affected by diet. Plasma total cholesterol contents significantly increased, whereas FFA levels decreased after HF diet in both groups. However, at 4 mo of age, whatever the feeding conditions (standard or HF diet), no significant difference was noted in plasma lipid parameters investigated between FR30 and C rats. Control and FR30 rats had comparable standard diet-fed as well as increased HF diet-fed plasma glucose and insulin concentrations (Table 2). As already described (7), during OGTT, partial glucose intolerance was observed in FR30 animals compared with C rats. However, although the HF diet induced marked impaired glucose tolerance, no difference was noted in glucose levels between HF diet-fed FR30 and C after an oral glucose load (data not shown).

FR30 rats had about twofold higher basal (0.71 ± 0.13 vs. 0.33 ± 0.04 ng/ml, $P < 0.01$) leptin concentration compared with C animals. In both groups, CHF and FR30HF serum leptin concentration was ~ 2.5 -fold higher than in standard diet-fed animals (C, 0.915 ± 0.12 vs. 0.33 ± 0.04 ng/ml; FR30, 1.86 ± 0.18 vs. 0.71 ± 0.13 ng/ml, respectively; $P < 0.001$; Table 2). Plasma adiponectin level was increased in FR30HF compared with CHF (17.74 ± 0.89 vs. 15.09 ± 0.6 ng/ml, $P < 0.05$), whereas no difference was observed between the two standard diet-fed groups. Under standard diet, FR30 rats had ~ 2.5 -fold higher corticosterone concentrations than C (10.8 ± 2.33 vs. 4.31 ± 0.99 μ g/dl, $P < 0.05$). Under HF diet, C animals' serum corticosterone concentration was ~ 3.5 -fold higher than in standard diet (14.39 ± 2.62 vs. 4.305 ± 0.99 μ g/d, $P < 0.01$). By contrast, FR30 rats showed no significant increase in corticosteronemia after HF diet compared with standard diet-fed FR30 animals.

Gene expression profile in adipose tissue. Surprisingly, FR30 MPU did not significantly affect the hypothalamic mRNA levels of genes present in PCR arrays. Very few gene expression changes were observed in FR30 vs. C adult rat hypothalamus whatever the regimen used (data not shown).

This is consistent with the absence of weight-related caloric intake difference observed between HF fed C and FR30 groups. By contrast, MPU led to marked gene expression variation in gonadal WAT, more especially under HF diet (Fig. 2, A and B, and Tables 3 and 4). For more clarity, we decided to present gene expression changes only as FR30/C ratio [FR30N vs. CN (Table 3) and FR30HF vs. CHF (Table 4)] and cut-off as -2 (downregulated genes) and >2 (overexpressed genes).

For example, RT-qPCR data showed that expression of leptin mRNA was higher (3.07-fold) in the FR30N group than in the CN group (Table 3), consistent with the increased levels of serum leptin observed in FR30N rats (Table 2). Leptin gene expression was elevated nearly twofold in CHF compared with CN rats, whereas FR30HF rats showed no additional gene expression increase compared with CHF animals. On the other hand, leptin mRNA expression was lower in the FR30HF group than in the CHF group (-1.31 -fold), which contrasted with the pattern found in serum leptin levels (Table 2). Compared with CN group, FR30N rats showed a significant decrease of the Ob-Rb mRNA levels (-1.53 -fold). However, FR30HF rats displayed a significant increase of Ob-Rb mRNA content vs. CHF rats ($+2.03$ -fold; Table 4). RT-qPCR experiments showed that several genes encoding neuropeptides and their receptors were also expressed in rat gonadal WAT (Fig. 2, A and B). Many of these genes are modulated by maternal FR30 procedure (Table 3) and/or following HF diet in the adult offspring rats (Table 4). BDNF, GH secretagogue receptor (GHS-R), gastrin-releasing peptide, melanocortin receptor 3 (MCR3), and opioid receptor k1 mRNA levels were highly downregulated (10.47-, 4.82-, 28.57-, 12.17-, and 10.97-fold, respectively) in FR30HF vs. CHF groups, whereas other genes, such as calcitonin receptor, gastrin-releasing peptide receptor and PYY, showed a markedly increased expression (8.34-, 15.15-, and 10.06-fold, respectively; Table 4).

To validate the RT-qPCR experiments, we determined the leptin and Ob-Rb mRNA variation levels in gonadal WAT on individual samples. The intensity of fold changes was on the same order of magnitude for both genes, confirming the data from the RT-qPCR experiments (Fig. 3A). In perirenal WAT,

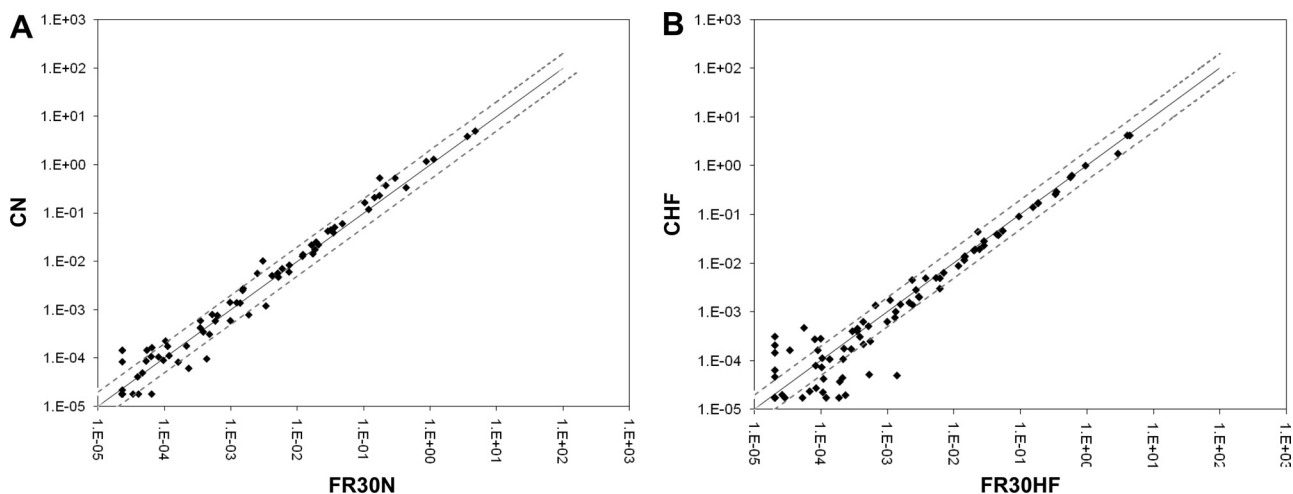


Fig. 2. Effects of maternal undernutrition on gene expression in gonadal white adipose tissue of adult FR30 and C rats under N and HF diet. Scatter plot analysis of 84 obesity-related genes from CN vs. FR30N (A) and CHF vs. FR30HF (B) rats. For each group, pools of the same amount of total RNA provided from 5 different animals were realized. Data are expressed as $2^{-\Delta C_T}$, where ΔC_T represents the difference between the C_T values for the gene of interest and those of housekeeping genes. Broken lines indicate 2-fold expression differences between samples.

Table 3. List of genes differentially expressed in gonadal white adipose tissue of adult FR30 vs. C under N diet

	UniGene	RefSeq Number	Symbol	FR30N	CN	FR30N/CN
Adrenergic receptor alpha 2b	Rn.10296	NM_138505	Adra2b	2.30E-04	1.00E-04	2.18
Adrenergic receptor beta 1	Rn.87064	NM_012701	Adrb1	1.00E-02	3.00E-03	3.39
Brain-derived neurotrophic factor	Rn.11266	NM_012513	BDNF	1.50E-04	5.40E-05	2.69
Dopamine receptor 2	Rn.87299	NM_012547	Drd2	1.80E-05	6.40E-05	-3.54
Glucagon	Rn.54383	NM_012707	Gcg	1.50E-04	2.30E-05	6.32
Glucagon receptor	Rn.11225	NM_172092	Gcgr	1.20E-03	3.40E-03	-2.79
Hypocretin	Rn.7628	NM_013179	HcRt	8.40E-05	2.30E-05	3.63
Leptin	Rn.44444	NM_013076	Lep	5.30E-01	1.70E-01	3.07
Peroxisome proliferative activated receptor- γ coactivator-1 α	Rn.19172	NM_031347	Ppargc1a	7.90E-04	1.90E-03	-2.35
Peptide YY	Rn.13173	NM_001034080	Pyy	6.20E-05	2.30E-04	-3.75
Receptor (calcitonin) activity-modifying protein-3	Rn.48672	NM_020100	Ramp3	5.70E-03	2.50E-03	2.26
Somatostatin receptor 1	Rn.42915	NM_012719	Sstr1	1.70E-04	6.50E-05	2.56
Thyrotropin-releasing hormone	Rn.22	NM_013046	Trh	1.40E-04	2.30E-05	6.24
Thyrotropin-releasing hormone receptor	Rn.9962	NM_013047	Trhr	1.80E-05	4.10E-05	-2.24
Uncoupling protein-1	Rn.10281	NM_012682	Ucp1	9.70E-05	4.30E-04	-4.46

RT-QPCR assays of 84 obesity-related genes (Rat Obesity RT2 Profiler PCR Array, SuperArray Bioscience, Frederick, MD, <http://www.superarray.com>). A pool of 5 samples containing equal amount of total RNA was realized in each group (CN and FR30N). Results are expressed as FR30N/CN ratio of $2\Delta C_T$ and cut off is <-2 (downregulated genes) and >2 (overexpressed genes).

the general profile of leptin gene expression was similar to the one determined in gonadal WAT. By contrast, both CN and FR30N rats showed an increased Ob-Rb mRNA levels (about +2.5-fold) compared with CHF and FR30HF rats (Fig. 4A).

Then, we focused on the expression of representative genes in two fat pads (gonadal and perirenal WAT) involved in WAT adipogenesis, proliferation and lipid metabolism (Figs. 3B and 4B, respectively). In gonadal WAT, we found that MPU increased mRNAs for gene involved in de novo lipogenesis, such as acetyl-CoA carboxylase (ACC, +2.76-fold) and fatty acid synthase (FAS, +2.83-fold), whereas no

difference was observed in gene expression levels for genes involved in adipogenesis such as CAAT enhancer binding protein- α (C/EBP α), peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), and preadipocyte factor 1 (PREF-1) in FR30N offspring. However, FAS, SREBP-1c/ADD1 (sterol regulatory element-binding protein-1c/adipocyte determination differentiation-dependent factor 1), C/EBP α , and PPAR γ were significantly decreased in CHF rats vs. CN animals (-3.10-, -2.38-, -2.88-, -4.74-fold, respectively), whereas gene expression levels remained elevated in FR30HF animals.

Table 4. List of genes differentially expressed in gonadal white adipose tissue of adult FR30 vs. C under HF diet

	UniGene	RefSeq Number	Symbol	FR30HF	CHF	FR30HF/CHF
Brain-derived neurotrophic factor	Rn.11266	NM_012513	BDNF	5.10E-05	5.40E-04	-10.47
Bombesin-like receptor 3	Rn.86415	NM_152845	Brs3	1.70E-05	1.20E-04	-7.04
Calcitonin receptor	Rn.10062	NM_053816	Calcr	4.70E-04	5.60E-05	8.34
Cholecystokinin A receptor	Rn.10184	NM_012688	Cckar	1.70E-05	5.30E-05	-3.1
Ciliary neurotrophic factor receptor	Rn.55036	NM_001003929	Cntfr	3.00E-03	6.20E-03	-2.07
Corticotropin-releasing hormone	Rn.10349	NM_031019	Crh	6.30E-05	2.00E-05	3.09
Dopamine receptor D1a	Rn.24039	NM_012546	Drd1a	2.80E-04	1.00E-04	2.8
Galanin receptor 1	Rn.10213	NM_012958	Galr1	2.70E-04	8.10E-05	3.34
Growth hormone secretagogue receptor	Rn.74241	NM_032075	Ghsr	4.40E-05	2.10E-04	-4.82
Melanin-concentrating hormone receptor 1	Rn.10822	NM_031758	Mchr1	2.10E-04	4.40E-04	-2.04
Gastrin-releasing peptide	Rn.10930	NM_133570	Grp	4.90E-05	1.40E-03	-28.57
Gastrin-releasing peptide receptor	Rn.10316	NM_012706	Grpr	3.10E-04	2.00E-05	15.15
Hypocretin (orexin) neuropeptide	Rn.7628	NM_013179	HcRt	1.60E-04	3.40E-05	4.72
Hypocretin (orexin) receptor 1	Rn.88262	NM_013064	HcRtr1	1.10E-04	2.20E-04	-2.04
Interleukin 1 alpha	Rn.12300	NM_017019	Il1a	2.30E-05	6.80E-05	-2.94
Insulin 2	Rn.989	NM_019130	Ins2	2.70E-05	8.50E-05	-3.15
Leptin receptor	Rn.9891	NM_012596	Lepr	1.40E-03	6.70E-04	2.03
Melanocortin 3 receptor	Rn.215838	NM_001025270	Mc3r	1.90E-05	2.40E-04	-12.17
Neurotensin	Rn.89709	NM_012799	Nmbr	3.70E-05	1.90E-04	-5.27
Neurotensin	Rn.60814	NM_001102381	Nts-preticted	2.20E-05	1.10E-04	-4.87
Opioid receptor kappa 1	Rn.89571	NM_017167	Oprk1	1.70E-05	1.90E-04	-10.97
Opioid receptor mu1	Rn.10118	NM_13071	Oprm1	1.40E-04	2.00E-05	7.04
Peptide YY	Rn.13173	NM_001034080	Pyy	2.10E-04	2.00E-05	10.06
Somatostatin	Rn.34418	NM_012659	Sst	4.60E-05	2.00E-05	2.25
Somatostatin receptor 1	Rn.42915	NM_012719	Sstr1	4.20E-05	1.10E-04	-2.63
Uncoupling protein-1	Rn.10281	NM_012682	Ucp1	2.50E-04	5.60E-04	-2.26

RT-qPCR assays of 84 obesity-related genes (Rat Obesity RT2 Profiler PCR Array, SuperArray Bioscience, <http://www.superarray.com>). A pool of 5 samples containing equal amount of total RNA was realized in each group (CN and FR30N). Results are expressed as FR30HF/CHF ratio of $2\Delta C_T$ and cut off is <-2 (downregulated genes) and >2 (overexpressed genes).

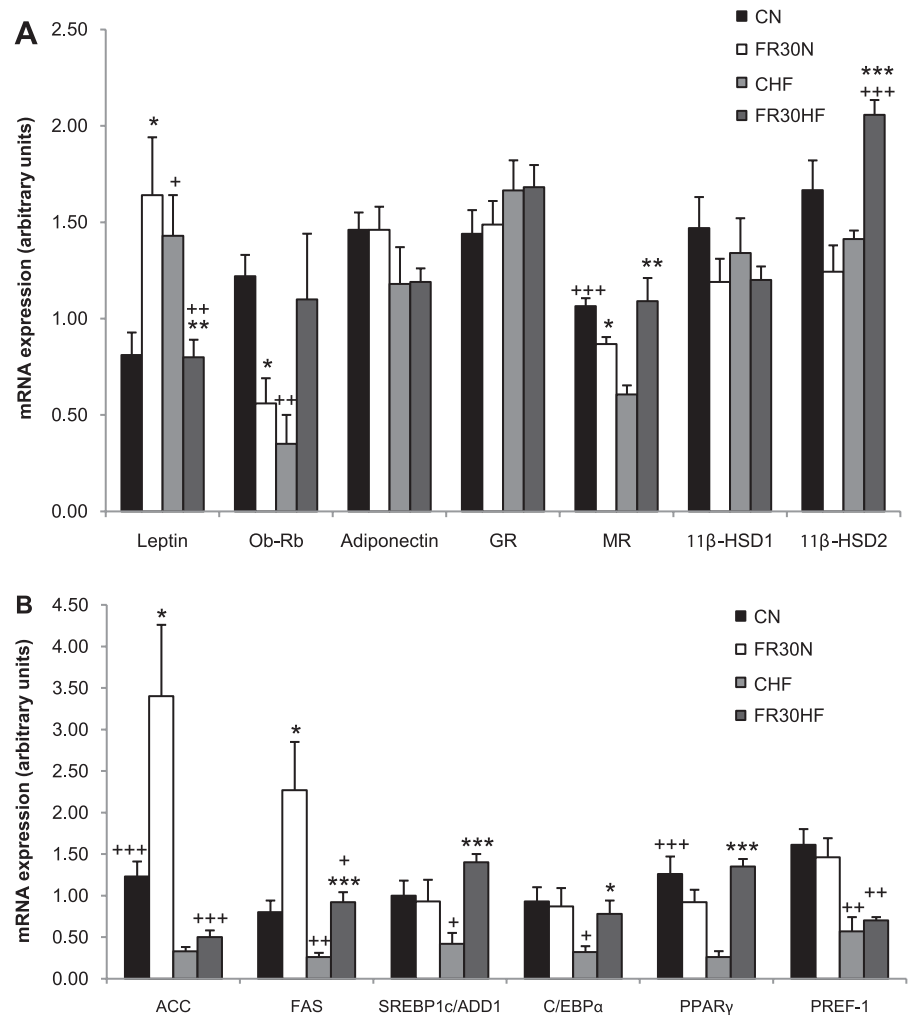


Fig. 3. Gene expression measurement from adult CN and FR30 rats under N and HF diet in gonadal white adipose tissue (WAT). mRNA abundance was measured by quantitative real-time PCR corrected for the mean of the abundance of cyclophilin and TBP (TATA box-binding protein) on individual samples ($n = 5$ per group). Gene symbols are detailed in Table 1. Data are means \pm SE compared by 2-way ANOVA followed by Neuman-Keuls post hoc testing. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$: FR30 vs. C in the same condition; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$: HF vs. N diet.

In perirenal WAT, ACC, FAS, and SREBP-1c/ADD1 mRNA levels are increased in FR30N rats vs. CN animals (+2.49-, +2.29-, and +1.76-fold, respectively), whereas no difference was observed in CEBP α and PPAR γ gene expression levels between both groups. However, unlike the gonadal WAT, SREBP-1c/ADD1, C/EBP α , and PPAR γ exhibited no gene expression difference between FR30HF and CHF rats. In gonadal and perirenal WAT, PREF-1 mRNA levels were reduced about twofold by HF diet in both groups. No variation was observed for adiponectin gene expression levels.

Among the genes involved in glucocorticoid (GC) sensitivity, we found that 11 β -HSD1, 11 β -HSD2, GR, and MR genes were coexpressed in both fat deposits. As indicated by the C_T values, the expression levels of the four genes showed differences within gonadal WAT of CN rats (11 β -HSD1, 26.44 ± 0.56 ; 11 β -HSD2, 30.99 ± 0.39 ; GR, 27.51 ± 0.75 ; MR, 29.49 ± 0.6). These data suggest that the 11 β -HSD1 gene expression levels were higher than the 11 β -HSD2 expression levels in adult rat WAT. In gonadal WAT, MR mRNA levels were reduced (-1.23 -fold) in FR30N vs. CN rats. MR gene expression was also decreased in CHF vs. CN rats (-1.75 -fold), whereas it remained elevated in FR30HF compared with FR30N group. 11 β -HSD2 gene expression was increased in FR30HF vs. FR30N and CHF rats (+1.65-, and +1.46-fold, respectively). In perirenal WAT, MR mRNA levels were

reduced ~ 1.5 -fold by HF diet in both groups. 11 β -HSD1 mRNA levels were decreased (-1.46 -fold) in FR30HF compared with FR30N group.

Effects of HF on histology of adipose tissue. To determine the effects of HF diet on adipocytes, we performed a histological morphometric analysis of gonadal WAT. As shown in representative photographs, the size of gonadal WAT adipocytes appeared similar between CN and FR30N rats (Fig. 5, A and B). However, FR30N animals exhibited a tendency for greater total area compared with CN rats (Fig. 5E). HF diet led to hypertrophied adipocytes to a similar extent in both groups (Fig. 5, C and D) (T, $91,076 \pm 3,838$ vs. $47,550 \pm 2,035 \mu\text{m}^2$; FR30, $92,819 \pm 3,660$ vs. $59,063 \pm 1,860 \mu\text{m}^2$, respectively; $P < 0.01$; Fig. 5E).

Effects of HF on STAT3 phosphorylation in adipose tissue. Considering the different levels of circulating leptin among the four CN, CHF, FR30N, and FR30HF groups (Table 2), we compared WAT leptin sensitivity by measuring STAT3 phosphorylation levels on WAT protein extracts. In each group, STAT3 phosphorylation levels were normalized to total STAT3 and calculated as a ratio. In both gonadal and perirenal fat pads, FR30N rats displayed decreased levels of STAT3 phosphorylation compared with CN rats (-2.65 - and -1.96 -fold, respectively; Fig. 6, A and B and C and D). HF diet led to a tendency for decreased STAT3 phosphorylation levels in

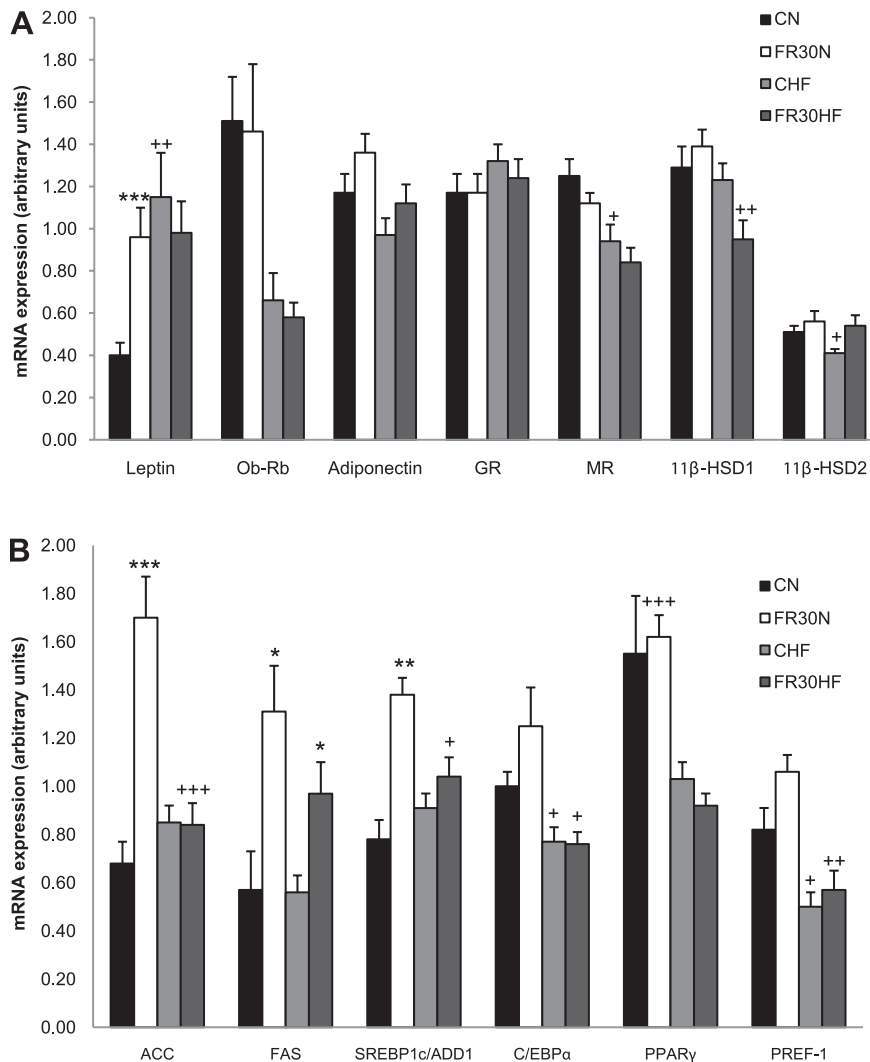


Fig. 4. Gene expression measurement from adult C and FR30 rats under N and HF diet in perirenal WAT. mRNA abundance was measured by quantitative real-time PCR corrected for the mean of the abundance of cyclophilin and TBP on individual samples ($n = 5$ per group). Gene symbols are detailed in Table 1. Data are means \pm SE compared by 2-way ANOVA followed by Neuman-Keuls post hoc testing. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$: FR30 vs. C in the same condition; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$: HF diet vs. N diet.

both gonadal and perirenal fat pads of C animals (-1.41 - and -1.82 -fold, respectively), whereas significantly increased levels were observed in FR30 rats ($+1.62$ - and $+2.11$ -fold, respectively; Fig. 6, A and B and C and D).

Presence of 11 β -HSD2 protein in adipose tissue. As shown in Fig. 7, Western blot analysis using specific antibody raised against rat 11 β -HSD2 clearly detected a single band in the expected molecular mass range of ~ 40 kDa in the protein extracts of gonadal (50 μ g, lane 3) and perirenal WAT (50 μ g, lane 4) and kidney (1 μ g, lane 1) in adult C rats. The largest amount was consistently detected in the kidney (lane 1), whereas no signal was detected in the brain (50 μ g, lane 2). Thus, we demonstrated that both fat deposits expressed a detectable level of 11 β -HSD2 protein. In addition, we observed a marked difference in the level of 11 β -HSD2 protein between the two different fat depots.

DISCUSSION

The major findings of this study are that, although MPU does not worsen the metabolic syndrome features induced by HF feeding, the FR30 procedure is associated with altered WAT transcriptional profile and may affect WAT leptin and

GC sensitivities leading to long-term depot-specific programming effects in male rat offspring.

Epidemiological data showed that nutritional conditions improve subsequent to low weight at birth, such as rich milk formula lactation, or in infancy, such as hypercaloric nutrition, increases the susceptibility for central obesity associated with increased risk of metabolic diseases (9, 29, 30, 50). Animal studies also confirmed these observations. In particular, feeding IUGR offspring a hypercaloric diet amplifies prenatal influences on obesity, hypertension, and hyperinsulinemia (4, 57). However, the underlying programming tissue mechanisms of adipose development remain elusive, especially under postweaning HF diet.

In the present study, we observed that postweaning HF diet modified total fat increment as well as lipid profile to a similar extent in both groups. Surprisingly, despite the partial glucose intolerance observed in FR30 rats under basal conditions (8), no obvious additional effects were noted under HF diet. As suggested (19), it may reflect a relatively mild programming phenotype. The modest elevation of plasma adiponectin, a key regulator of insulin sensitivity, may contribute to the protective effect against glucose intolerance (49).

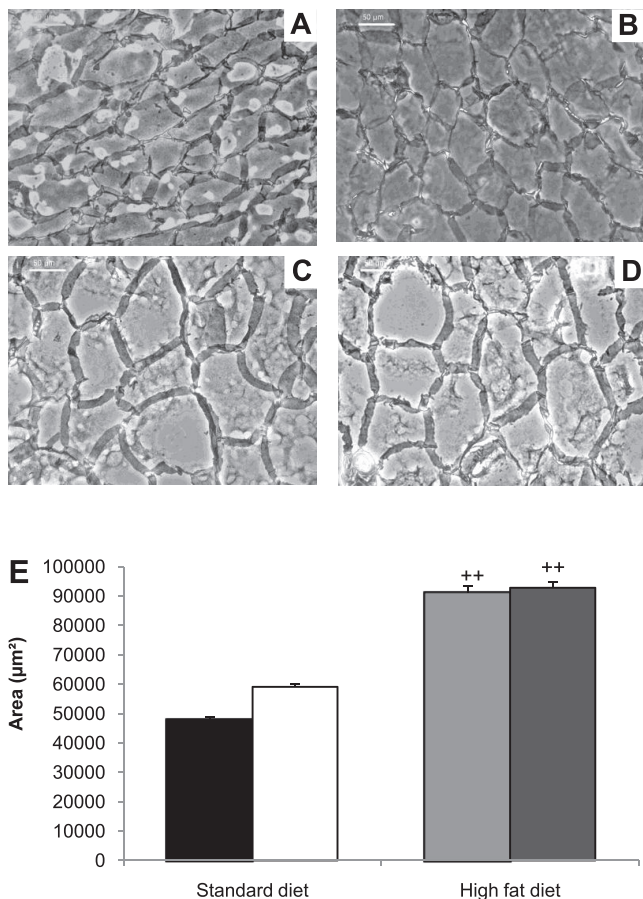


Fig. 5. Fat pad histology. Paraffin-embedded sections of gonadal WAT from CN (■; A), FR30N (□; B), CHF (■; C), and FR30HF (■; D) adult rats were stained with Oil red O. Representative photomicrographs are shown. Scale bars, 100 μm. E: quantification of adipocyte size was indicated (total area in μm²; n = 5 per group). Data are means ± SE compared by 2-way ANOVA followed by Neuman-Keuls post hoc testing. ++P < 0.01.

Our findings disagree with those of Vickers et al. (57), who reported that hypercaloric nutrition dramatically amplified the FR30 model endocrine disorders observed under standard diet. This discrepancy may be due to the fact that pups from undernourished mothers were cross-fostered onto dams that had received ad libitum feeding. This finding emphasizes the importance of the suckling period and catch-up growth during early lactation of undernourished pups for developmental programming of future diseases. The differing outcome of IUGR offspring might also lie in the timing of sensitive developmental windows, the nature of the deleterious stimulus experienced, the genetic background of the species, or the regimen used (4, 13, 29, 49). In line, administration of the maternal prenatal synthetic glucocorticoid dexamethasone in rats results in low-birth-weight offspring that subsequently develop glucose intolerance and hypertension in adulthood. However, this IUGR procedure does not confer increased sensitivity to HF diet-induced obesity (19).

However, we observed that FR30HF rats displayed catch-up growth to match the body weight of adult CHF animals while showing hyperleptinemia and a blunted increase of corticosterone. The elevated serum leptin concentration suggests an increase of adiposity in FR30HF rats, although we cannot rule

out that hyperleptinemia may originate from other tissues (47) and/or that our model of IUGR alters adipose tissue distribution in adulthood (32). These observations prompted us to focus our further investigations on WAT adult FR30 offspring.

Using quantitative RT-PCR array containing 84 obesity-related genes, we demonstrated that, unlike hypothalamus, gonadal WAT is a very sensitive target of MPU programming, especially under HF diet. This reinforces the idea of the existence of a brain sparing effect under suboptimal nutritional conditions (16, 37). In particular, RT-qPCR experiments identified the leptin and Ob-Rb genes but also many mRNAs encoding peptide precursors, receptors, and proteins involved in energy homeostasis regulation as particularly good candidates. Some of them could act in an autocrine/paracrine manner to regulate adipocyte metabolism (16, 60, 63). Indeed, it has been shown that ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention (14) whereas α-MSH interacts with WAT MCR3 to induce lipolysis (27). Both PYY and NPY promoted proliferation of adipocyte precursor cells and exhibited antilipolytic properties in visceral WAT (62). However, since their level of expression is weak, further analyses will be required to assess the physiological significance, if any, of these variations.

In addition to showing a tendency for greater adipocyte area, we demonstrated that the expression of genes involved in adipogenesis was modified in FR30 animals in depot-specific and diet-specific manners. Such alterations favoring fat storage might be advantageous to survival under poor nutrition conditions and are in accordance with the thrifty phenotype hypothesis (18, 19, 26, 32). In line, uteroplacental insufficiency-induced IUGR increases visceral adiposity and visceral adipose PPARγ expression in male rat offspring prior to the onset of overt obesity (46). These findings are consistent with the concept that in humans IUGR adipose tissue appears dysregulated before the onset of obesity (9, 30). By contrast, a global transcriptomic approach indicated that 55-day-old offspring of undernourished rat dams during gestation displayed no difference in WAT gene expression, pointing out sensitive developmental windows programming differences (41).

We demonstrated that the overall lipogenic mRNA transcript profiles revealed a marked tendency for increase in FR30 rats under HF diet. Controversial data about the regulation of lipogenic key factors have been published in DIO-induced rat obesity models (34, 36) and in obese human subjects (45) regarding the time-dependent effects of a high-fat-yielding diet. Indeed, it may be that during the period of “dynamic obesity,” when fat stores are rapidly expanding, an increase in the lipogenic capacity of adipose tissue is expected, but, in obese subjects with a large and long-lasting fat excess, the decreased expression of lipogenic genes could be a late and adaptive process aimed, in fact, at preventing a further development of fat mass (45). Thus, the different HF feeding outcome in WAT FR30 lipogenic gene expression rats suggests that MPU alters the timing of fat deposition at least at the level of gene expression that may favor long-term fat storage.

In agreement with RT-PCR array results, indicating the WAT leptin system as a key target of MPU programming, we confirmed that leptin and Ob-Rb mRNA expressions were modified in FR30 offspring in depot-specific and diet-specific manners. For the latter, this is in agreement with studies showing depot-specific gene expression levels in adipose tissue

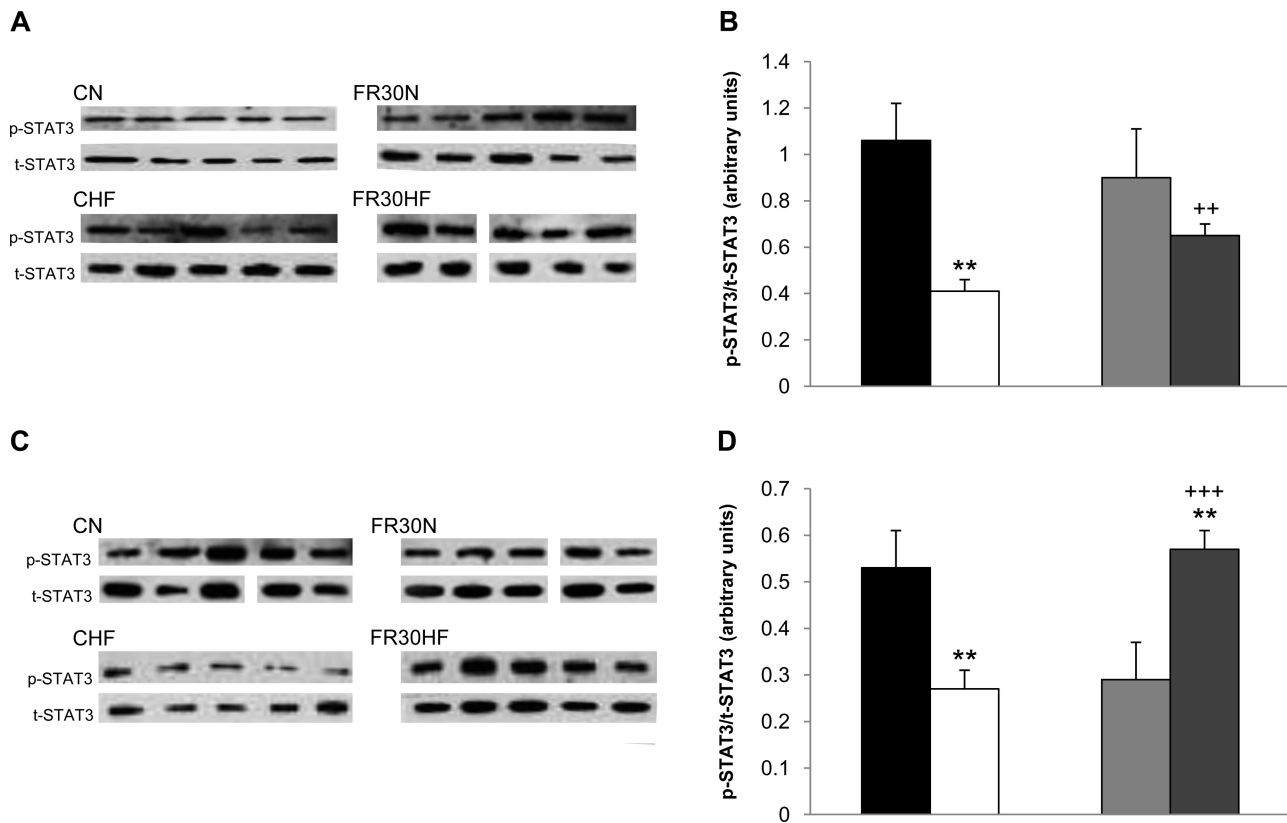


Fig. 6. Western blot analysis of phosphorylated (p-) and total (t-)STAT3 in WAT protein extracts from adult C and FR30 rats under N or HF diet. Seven animals per group (6 for FR30HF) were used to determine sensitivity toward leptin in WAT. Equal amounts of protein from each sample (15 μ g) were used. Representative photographs of 5 animals are shown (A, gonadal WAT; C, perirenal WAT). Separation by white space indicates that both FR30HF (A) and FR30N (C) photographs reassemble noncontiguous lanes of gel. Bottom of the CN (C) photograph is spliced to indicate band shift restoration. For quantification, in each group, sensitivity toward leptin was assessed by calculation of the mean p-STAT3/t-STAT3 ratio (in arbitrary units of OD/mm²) (B, gonadal WAT; D, perirenal WAT) CN (■), FR30N (□), CHF (■), and FR30HF (■) adult rats. Data are means \pm SE compared by 2-way ANOVA followed by Neuman-Keuls post hoc testing. ** $P < 0.01$: FR30 vs. C in the same condition; ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$: HF diet vs. N diet.

(20). We hypothesized that these might, at least in part, account for modified WAT leptin sensitivity and may thus affect its antilipogenic action (28, 31, 55, 61).

Hyperleptinemia may be interpreted as a leptin-resistant state (57). First, whatever diet we used, we found no gross expression difference of hypothalamic appetite-regulatory factor gene expression as well as food intake between C and FR30 groups (data not shown). FR30 rats might have developed an adaptive resetting neuronal activation threshold that could

explain normalized orexigenic and anorexigenic gene expression levels (8, 51). Second, despite hyperleptinemia, FR30N rats displayed decreased levels of STAT3 phosphorylation compared with CN rats in WAT. In accordance with that, considering the antilipogenic leptin action on WAT (28, 31, 55, 61), we did not observe any suppression of ACC and FAS gene expression in FR30N animals, but a marked increased expression. Finally, under HF diet, and despite a similar twofold rise of plasma leptin concentration in both groups, we observed an opposite variation of WAT STAT3 phosphorylation levels, suggesting that leptin sensitivity is modified in WAT adult FR30 offspring.

Finally, we demonstrated, for the first time, that 11 β -HSD1, 11 β -HSD2, GR, and MR genes are coexpressed in rat WAT and that mRNA transcript profiles revealed depot-specific and diet-specific changes. In particular, we showed that MPU modifies the expression of genes involved in GC/mineralocorticoid tissue sensitivity by increasing 11 β -HSD2 and MR mRNA levels in gonadal WAT FR30HF offspring. We also detected, for the first time, the 11 β -HSD2 protein in WAT, whose expression levels differ between the depots.

Several lines of evidence prompted us to explore whether WAT GC sensitivity is modified in adult FR30 offspring. First, we had previously shown that maternal undernutrition programs the offspring HPA axis throughout the lifespan (35, 53).

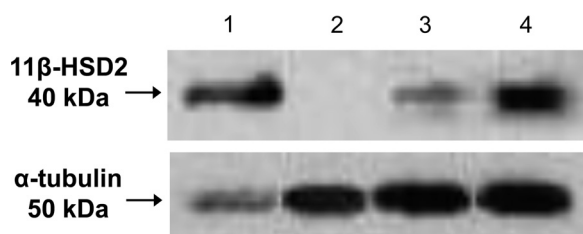


Fig. 7. Western blot analysis of 11 β -HSD2 in WAT protein extracts from adult C rats. Total protein extracts were subjected to immunoblot analysis using sheep anti-rat 11 β -HSD2 and mouse anti-rat α -tubulin antibodies. Representative Western blot of three similar analyses are shown. Lane 1, protein extracts (1 μ g) from whole kidney (positive control). Lane 2, protein extracts (50 μ g) from total brain (negative control). Lanes 3 and 4, protein extracts (50 μ g) from perirenal and gonadal WAT, respectively. Position of molecular mass is shown at the left.

Second, we and others (6, 10, 21, 23, 44) demonstrated that IUGR offspring exhibit long-term and tissue-specific effects on gene expression of factors involved in GC sensitivity. In particular, plasma corticosterone and aldosterone levels were increased in adult male FR30 rats (8, 52) that may directly modulate WAT adipogenesis (38, 64). Third, several studies have shown that modified WAT GC sensitivity leads to altered fat accumulation. Increased expression of GR and 11 β -HSD1 in visceral adipose tissue has been associated with the development of obesity in humans (56, 59) and in rats overfed in early postnatal stages (5, 6). In mice, overexpression of 11 β -HSD1 in adipose tissue resulted in visceral obesity (39) when fed under HF diet, whereas adipose tissue overexpression of 11 β -HSD2 protects mice from HF diet-induced obesity (33).

Our findings support the hypothesis that MPU might affect the ratio between 11 β -HSD1 and 11 β -HSD2 expression in WAT adult FR30 offspring, thus modifying local tissue ratios between active and inactive GC. In response to HF diet, the depot-specific upregulation of 11 β -HSD2 mRNA while 11 β -HSD1 expression remains stable might limit corticosterone concentration within its local environment, thus diminishing responsiveness to GC. This may represent an adaptive mechanism that may counteract excess fat storage (40). However, additional experiments such as 11 β -HSD1 and 11 β -HSD2 protein levels and/or enzymatic activities as well as GC binding capacity assessments should be performed to determine the extent to which MPU may affect WAT GC sensitivity in adult FR30 offspring.

In contrast with 11 β -HSD1, the cellular localization of 11 β -HSD2 within WAT remains unclear. In rat, 11 β -HSD2 gene was expressed by both adipocytes and stromal-vascular cells (40) whereas in humans 11 β -HSD2 mRNAs were detected predominantly in the stromal fraction (56). Alternatively, or in addition, 11 β -HSD2 expression in WAT stromal-vascular cells fraction might protect nonmature adipocytes from active GC spillover (40, 56). Further immunohistochemical experiments are needed to precisely determine the WAT cell type expressing the 11 β -HSD2, especially in adult FR30 offspring. These studies could contribute to a better understanding of its local and/or paracrine role as well as mechanism of action within the WAT microenvironment.

In conclusion, we have demonstrated that MPU differently programs the long-term offspring adipose tissue gene expression profile in a depot-specific manner that may predispose prenatally undernourished individuals to altered lipid metabolism and fat accumulation, specifically within an obesogenic environment.

GRANTS

This study was supported by grants from the French Ministry of Education and grants of the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

- Ahima RS, Singhal NS. Adipokines that link obesity and diabetes to the hypothalamus. *Prog Brain Res* 153: 155–174, 2006.
- Barker DJ. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr* 93: 26–33, 2004.
- Bieswal F, Hay SM, McKinnon C, Reusens B, Cuignet M, Rees WD, Remacle C. Prenatal protein restriction does not affect the proliferation and differentiation of rat preadipocytes. *J Nutr* 134: 1493–1499, 2004.
- Bol VV, Delattre AI, Reusens B, Raes M, Remacle C. Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R291–R299, 2009.
- Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver Grino MC. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood. *Diabetes* 54: 197–203, 2005.
- Boullu-Ciocca S, Achard V, Tassistro V, Dutour A, Grino M. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. *Diabetes* 57: 669–677, 2008.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304: 108–110, 2004.
- Breton C, Lukaszewski MA, Risold PY, Enache M, Guillemot J, Rivière G, Delahaye F, Lesage J, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Vieau D. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E462–E472, 2009.
- Chakraborty S, Joseph DV, Bankart MJ, Petersen SA, Wailoo MP. Fetal growth restriction: relation to growth and obesity at the age of 9 years. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 92: F479–F483, 2007.
- Cleasby ME, Kelly PAT, Walker BR, Seckl JR. Programming of rat muscle and fat metabolism by *in utero* overexposure to glucocorticoids. *Endocrinology* 144: 999–1007, 2003.
- Cottrell EC, Ozanne SE. Developmental programming of energy balance and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc* 66: 198–206, 2007.
- Coupé B, Amarger V, Grit I, Benani A, Parnet P. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Neuroendocrinology* 151: 702–713, 2010.
- Coupé B, Grit I, Darmaun D, Parnet P. The timing of “catch-up growth” and appetite regulation in male born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R813–R824, 2009.
- Davies JS, Kotokorpi P, Eccles SR, Barnes SK, Tokarczuk PF, Allen SK, Withworth HS, Gushina IA, Evans BAJ, Mode A, Zigman JM, Wells T. Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Mol Endocrinol* 23: 914–924, 2009.
- Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 149: 470–475, 2008.
- Delahaye F, Lukaszewski MA, Dutriez-Casteloot I, Montel V, Dickes-Coopman A, Laborie C, Lesage J, Breton C, Vieau D. Maternal perinatal undernutrition programs a “brown-like” phenotype of gonadal white fat in male rat at weaning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R101–R110, 2010.
- Desai M, Gayle D, Han G, Ross MG. Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod Sci* 14: 329–337, 2007.
- Desai M, Guang H, Ferelli M, Kallichanda N, Lane RH. Programmed upregulation of adipogenic transcription factors in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod Sci* 15: 785–796, 2008.
- Drake AJ, Raubenheimer PJ, Kerrigan D, McInnes KJ, Seckl JR, Walker BR. Prenatal dexamethasone programs expression of genes in liver and adipose tissue and increased hepatic lipid accumulation but not obesity on a high-fat diet. *Endocrinology* 151: 1581–1587, 2010.
- Duque-Guimarães DE, de Castro J, Martinez-Botas J, Sardinha FL, Ramos MP, Herrera E, do Carmo MG. Early and prolonged intake of partially hydrogenated fat alters the expression of genes in rat adipose tissue. *Nutrition* 25: 782–789, 2009.
- Dutriez-Casteloot I, Breton C, Coupé B, Hawchar O, Enache M, Dickes-Coopman A, de Keyzer Y, Deloof S, Lesage J, Vieau D. Tissue-specific programming expression of glucocorticoid receptors and 11 β -HSDs by maternal perinatal undernutrition in the HPA axis of adult male rats. *Horm Metab Res* 40: 1–5, 2008.
- Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 88: 234–243, 2006.
- Gnanaalingham MG, Mostlyn A, Symonds ME, Stephenson T. Ontogeny and nutritional programming of adiposity in sheep: potential role of

- glucocorticoid action and uncoupling protein-2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1407–R1415, 2005.
24. Gosby AK, Maloney CA, Caterson ID. Elevated insulin sensitivity in low-protein offspring rats is prevented by a high-fat diet and is associated with visceral fat. *Obesity* 18: 1593–1600, 2010.
 25. Grayson BE, Kievit P, Smith MS, Grove KL. Critical hypothalamic appetitive development and expression: species considerations. *Front Neuroendocrinol* 31: 16–31, 2010.
 26. Guan H, Arany E, van Beek JP, Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill DJ, Yang K. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E663–E673, 2005.
 27. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Rayner DV. Regulation of adipose tissue leptin secretion by α -melanocyte-stimulating hormone and agouti-related protein: further evidence of an interaction between leptin and the melanocortin signalling system. *J Mol Endocrinol* 32: 145–153, 2004.
 28. Huan JN, Li J, Han Y, Chen K, Wu N, Zhao AZ. Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *J Biol Chem* 278: 45638–45650, 2003.
 29. Ibanez L. Early Development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2153–2158, 2006.
 30. Jaquet D, Deghmoun S, Chevenne D, Collin D, Czernichow P, Lévy-Marchal C. Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. *Diabetologia* 48: 849–855, 2005.
 31. Jiang L, Wang Q, Yu Y, Zhao f Huang P, Zeng R, Qi RZ, Li W, Liu Y. Leptin contributes to the adaptive responses of mice to high-fat diet intake through suppressing the lipogenic pathway. *PLoS One* 4: e6884, 2009.
 32. Joss-Moore LA, Wang Y, Campbell MS, Moore B, Yu X, Callaway CW, McKnight RA, Desai M, Moyer-Mileur LJ, Lane RH. Uteroplacental insufficiency increases visceral adiposity and visceral adipose PPARgamma2 expression in male rat offspring prior to the onset of obesity. *Early Hum Dev* 3: 179–185, 2010.
 33. Kershaw EE, Morton NM, Dhillon H, Ramage L, Seckl JR, Flier JS. Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes* 54: 1023–1031, 2005.
 34. Kim YJ, Park T. Genes are differentially expressed in the epididymal fat of rats rendered obese by a high-fat diet. *Nutrition Res* 28: 414–422, 2008.
 35. Lesage J, Sebaai N, Léonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, Vieau D. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 9: 183–198, 2006.
 36. Li J, Yu X, Pan W, Unger RH. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1334–E1341, 2002.
 37. Lumbers ER, Yu ZY, Gibson KJ. The selfish brain and the Barker hypothesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 942–947, 2001.
 38. Macfarlane DP, Forbes S, Walker SF. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol* 197: 189–204, 2008.
 39. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294: 2166–2170, 2001.
 40. Milagro FI, Campion J, Martínez A. 11- β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in white adipose tissue is strongly correlated with adiposity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104: 81–84, 2007.
 41. Morris TJ, Vickers M, Gluckman P, Gilmour S, Affara N. Transcriptional profiling of rats subjected to gestational undernourishment: implications for the developmental variations in metabolic traits. *PLoS One* 4: e7271, 2009.
 42. Muhlhauser B, Smith SR. Early-life origin of metabolic dysfunction: role of the adipocyte. *Trends Endocrinol Metab* 2: 51–57, 2009.
 43. Nieuwenhuizen AG, Rutters F. The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiol Behav* 94: 169–177, 2008.
 44. Nyirenda MJ, Carter R, Tang JL, de Vries A, Schlumbohm C, Hillier SG, Streit F, Oellerich M, Armstrong VW, Seckl JR. Prenatal programming of metabolic syndrome in the common marmoset is associated with increased expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Diabetes* 58: 2873–2879, 2009.
 45. Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Esteve E, Rodríguez-Hermosa JJ, Ruiz B, Ricart W, Peral B, Frühbeck G, Tinahones FJ, Fernández-Real JM. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity* 18: 13–20, 2010.
 46. Ozanne SE, Dorling MW, Wang CL, Nave BT. Impaired PI 3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E534–E539, 2001.
 47. Pico C, Sanchez J, Oliver P, Palou A. Leptin production by the stomach is up-regulated in obese (fa/fa) Zucker rats. *Obes Res* 10: 932–938, 2002.
 48. Plagemann A, Waas T, Harder T, Rittel F, Ziska T, Rohde W. Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Neuropeptides* 34: 1–6, 2000.
 49. Prior LJ, Velkoska E, Watts R, Cameron-Smith D, Morris MJ. Undernutrition during suckling in rats elevates plasma adiponectin and its receptor in skeletal muscle regardless of diet composition: a protective effect? *Int J Obes* 32: 1585–1594, 2008.
 50. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 70: 811–816, 1999.
 51. Remmers F, Verhagen LA, Adan RA, Delemarre-van de Waal HA. Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. *Endocrinology* 149: 3617–3625, 2008.
 52. Rivière G, Michaud A, Breton C, VanCamp G, Laborie C, Enache M, Lesage J, Deloof S, Corvol P, Vieau D. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension* 46: 1169–1174, 2005.
 53. Sebaai N, Lesage J, Breton C, Vieau D, Deloof S. Perinatal food deprivation induces marked alterations of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in 8-month old male rats both under basal conditions and after a dehydration period. *Neuroendocrinology* 79: 163–173, 2004.
 54. Simmons R. Developmental origins of adult metabolic disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 35: 193–204, 2006.
 55. Soukas A, Cohen P, Succi ND, Friedman JM. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 14: 963–980, 2000.
 56. Lee MJ, Fried SK, Mundt SS, Wang Y, Sullivan S, Stefanni A, Daugherty BL, Hermanowski-Vosatka A. Depot-specific regulation of the conversion of cortisone to cortisol in human adipose tissue. *Obesity* 16: 1178–1185, 2008.
 57. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E83–E87, 2000.
 58. Vuguin PM. Animal model for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm Res* 68: 113–123, 2007.
 59. Wake DJ, Walker BR. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 215: 45–54, 2004.
 60. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol* 216: 3–13, 2008.
 61. Wang MY, Orci L, Ravazzola M, Unger RH. Fat storage in adipocyte requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18011–18016, 2005.
 62. Yang K, Guan H, Arany E, Hill DJ, Xiang Cao. Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via the Y1 receptor. *FASEB J* 22: 2452–2464, 2008.
 63. Yang YS, Song HD, Li RY, Zhou LB, Zhu ZD, Hu RM, Han ZG, Chen JL. The gene expression profiling of human visceral adipose tissue and its secretory functions. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 839–846, 2003.
 64. Zennaro MC, Caprio M, Fève B. Mineralocorticoid receptors in the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 20: 444–451, 2009.
 65. Zhang T, Guan H, Arany E, Hill DJ, Yang K. Maternal protein restriction permanently programs adipocyte growth and development in adult male rat offspring. *J Cell Biochem* 101: 381–388, 2007.

Bien que la DM n'exacerbe pas les perturbations métaboliques induites par le régime HF, les animaux mâles FR30HF adultes présentent une augmentation de la masse corporelle comparée aux rats THF associée à une hyperleptinémie et un taux stable des glucocorticoïdes circulants, suggérant une sensibilité accrue à l'adiposité.

L'analyse des RT-PCR arrays quantitatifs a montré que, contrairement à l'hypothalamus, le profil d'expression du TA est très sensible à la programmation fœtale induite par la DM, et ce tout particulièrement sous régime HF. L'ensemble de nos données montre que la DM programme de manière différentielle le profil d'expression génique du TA en fonction de la localisation du dépôt de tissu adipeux. En particulier, l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la lipogenèse, est augmentée chez les rats FR30 en régime standard. Ces altérations favoriseraient le stockage des lipides et pourraient, en accord avec l'hypothèse du « *thrifty phenotype* », être un avantage à la survie en milieu pauvre en nutriments. Par contre, sous régime HF, l'expression de ces gènes a tendance à diminuer chez les animaux FR30, ce qui pourrait refléter un mécanisme d'adaptation. Ces modulations suggèrent que la DM pourrait altérer le stockage des triglycérides dans le TA et contribuer à une sensibilité à l'adiposité perturbée à long terme. Plus particulièrement, le système leptine du TA (hormone et récepteur) apparaît comme une cible privilégiée de la programmation génique. Cependant, en dépit de l'hyperleptinémie, les rats FR30 présentent une diminution du taux de phosphorylation de STAT3 dans le TA, comparé aux T en régime standard. De plus, sous régime HF, bien que la concentration de leptine soit augmentée dans les deux groupes, nous avons observé des variations opposées de la phosphorylation de STAT3 entre les rats FR30 et T, suggérant une modification de la sensibilité de la réponse à la leptine dans le TA chez le FR30, qui semble également être dépôt adipeux-spécifique.

Nous avons également démontré que des gènes impliqués dans la sensibilité tissulaire aux glucocorticoïdes, à savoir la 11 β -HSD1, la 11 β -HSD2, et les récepteurs MR et GR, sont coexprimés dans le TA et modulés chez les rats FR30, notamment sous régime HF. Les variations de l'expression de la 11 β -HSD2 pourraient, tout particulièrement, représenter un nouveau mécanisme de modulation de la sensibilité aux glucocorticoïdes dans le TA.

Discussion

I. L'absence de « catch-up » : une protection contre le développement du syndrome métabolique ?

A. Conservation de l'intégrité de l'hypothalamus

En condition basale, nous n'avons observé aucune différence de marquage du nombre de neurones à POMC ou à NPY du NA, ni de la densité de leurs projections, chez les rats FR30 adultes. Cependant, de nombreux modèles de manipulation nutritionnelle périnatale, ont montré une altération de la mise en place des connexions hypothalamiques (Plagemann *et al.*, 2000a ; Delahaye *et al.*, 2008 ; Coupé *et al.*, 2010). De récents travaux menés au laboratoire ont, en effet, mis en évidence dans un modèle de DM à 50 % durant la dernière semaine de gestation et toute la durée de la lactation, le modèle FR50, des perturbations de la mise en place des projections des neurones à POMC du NA vers le NPV de la descendance lors du développement (Delahaye *et al.*, 2008). Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle ces perturbations hypothalamiques seraient latentes en condition standard et que des conditions nutritionnelles extrêmes pourraient les dévoiler.

Suite à un jeûne de 48 heures, les animaux FR30 ne présentent pas de différence de l'expression ni du marquage des fibres à POMC dans l'hypothalamus, tandis qu'elles sont diminuées chez les animaux T. Les neurones à POMC semblent donc être une cible centrale privilégiée de la programmation fœtale induite par la DM. Les rats FR30 montrent donc une adaptation au jeûne. Cette hypothèse semble se confirmer par leur comportement durant la reprise alimentaire qui est effectivement plus faible chez les rats FR30, durant la 1^{ère} heure de réalimentation. De plus, en accord avec la théorie du « *thrifty phenotype* », il semble logique que, suite à une sévère DM, les fœtus FR30 se soient adaptés à la survie dans un environnement pauvre en nutriments.

Contrairement à de nombreux modèles qui ont montré une désorganisation du système NPY chez la descendance (Rajakumar *et al.*, 1998 ; Desai *et al.*, 2007b ; Ikenasio-Thorpe *et al.*, 2007 ; López *et al.*, 2005a ; Remmers *et al.*, 2008), ces altérations sont négligeables chez l'adulte FR30.

Toutefois des études ont montré que la leptine module la plasticité synaptique dans l'hippocampe et le NA (Harvey *et al.*, 2006 ; Horvath, 2006). En effet, un apport exogène de leptine chez la souris *ob/ob*, module les signaux excitateurs et inhibiteurs émis par les neurones à NPY et POMC (Pinto *et al.*, 2004). De plus, l'activité électrophysiologique de ces neurones retrouve des valeurs similaires à celles des souris T. Ces données indiquent que la leptine est capable d'induire des changements rapides de la plasticité des synapses des neurones du NA de l'hypothalamus. Il est donc possible que l'hypoleptinémie supposée dans le lait provenant des mères FR30 durant le développement et/ou l'hyperleptinémie observée chez les rats FR30 adultes, induisent de subtiles altérations de la plasticité des synapses des neurones à NPY et/ou à POMC, qui ne seraient pas visibles avec la technique d'immunohistochimie utilisée dans nos études.

Cependant, contrairement aux modèles montrant des altérations des connexions neuronales hypothalamiques, les animaux FR30 ne présentent pas de « *catch-up* » précoce, mais un rattrapage progressif et partiel de leur croissance, avec un poids qui reste 10 % inférieur à celui des T à l'âge adulte. Il est désormais clairement établi qu'un rattrapage de croissance suite à un RCIU, favorise les altérations des connexions hypothalamiques, ainsi que la prévalence de pathologies associées au SM (Eriksson *et al.*, 2003 ; McMillen and Robinson, 2005). En effet, lorsque des rats RCIU sont soumis à un régime HF dès le sevrage, ils présentent une hyperphagie associée à une augmentation de l'expression génique du NPY, de l'AgRP et de la POMC dans l'hypothalamus, à l'âge adulte (Ikenasio-Thorpe *et al.*, 2007).

Dans notre modèle, bien que les mères retrouvent un régime alimentaire standard dès la parturition, il est possible que la qualité de leur lait soit altérée. De plus, une étude a montré, chez la truie, l'importance du stockage d'acides gras dans le TA maternel, sur la composition du lait (Amusquivar *et al.*, 2010). Les femelles dénutries présentent assurément une très forte diminution de la masse de leur TA, et par conséquent de leur contenu en triglycérides, ce qui pourrait affecter la qualité du lait jusqu'à ce qu'elles retrouvent un état physiologique énergétique normal. Les nouveau-nés seraient alors confrontés à un environnement nutritionnel s'enrichissant graduellement, ce qui éviterait un « *catch-up* » brutal et leur permettrait d'adapter progressivement, la maturation de leur cerveau.

De nombreuses études ont démontré l'action neurotrophique de la leptine, ce qui en ferait un des mécanismes majeurs de la programmation fœtale et/ou postnatale (Vickers *et al.*, 2005 ; Bouret and Simerly, 2006). Les connexions hypothalamiques entre le NA et les autres noyaux impliqués dans la régulation de la balance énergétique, se développent progressivement sous l'influence de la leptine au cours de la lactation (Bouret *et al.*, 2004). C'est tout particulièrement l'existence d'un pic de la concentration de leptine aux environs du 10^{ème} jour de vie postnatale chez le souriceau et le rat, qui serait impliquée dans ce mécanisme (Ahima *et al.*, 1998 ; Bouret *et al.*, 2004 ; Delahaye *et al.*, 2008). L'origine de la leptine néonatale reste toutefois inconnue. Elle pourrait, en effet, provenir du TA ou de l'estomac du raton, mais également du TA de la mère via la lactation et/ou le transport placentaire (Bado *et al.*, 1998 ; Casabiell *et al.*, 1997 ; Stocker *et al.*, 2004). Or, des études ont montré que la concentration de leptine est modulée par la nutrition postnatale (Delahaye *et al.*, 2008 ; Coupé *et al.*, 2010). La DM pourrait donc affecter la concentration en leptine du lait, dans notre modèle FR30. En effet, il a été montré au sein du laboratoire que le modèle FR50 présente une diminution de la concentration de leptine tout au long de la lactation, ainsi qu'une absence du pic de concentration de cette hormone (Delahaye *et al.*, 2008). Cette altération pourrait être la cause, au moins en partie, des perturbations de la mise en place des connexions hypothalamiques des neurones à POMC entre le NA et le NPV, observées dans le modèle FR50. Nous ne pouvons exclure que les rats FR30 présentent une telle perturbation en période postnatale. Cependant, étant donné les différences de la fenêtre d'application et de l'intensité de la DM entre les modèles, il est possible que la DM n'altère pas la concentration de leptine de la même façon chez les animaux FR30. En effet, une diminution moins importante de la concentration de leptine, pourrait expliquer que nous n'observions pas de perturbations marquées de l'architecture du système anorexigène chez les animaux FR30 adulte, mais uniquement une altération de sa réponse à un jeûne de longue durée. Une autre étude a, quant à elle, montré chez la souris, un décalage du pic de la concentration de leptine suite à une DM de 70 % à partir du 10^{ème} jour de gestation jusqu'à la parturition (Yura *et al.*, 2005). Il est donc possible que la programmation de l'altération de la réponse anorexigène au jeûne dans le modèle FR30, résulte, en partie, d'un décalage du pic de la concentration de leptine durant la période postnatale. Cependant, il est important de noter que les acteurs de la programmation hypothalamique induite par la DM périnatale, sont, en dehors de la leptine, très peu connus et peuvent être différents en fonction des modèles utilisés.

L'approche transcriptomique globale menée sur l'hypothalamus des animaux FR30, à l'aide de RT-PCR arrays quantitatifs contenant 84 gènes dédiés à l'obésité, n'a pas montré de différence majeure d'expression, entre les rats FR30 et T. En nous basant sur la théorie de la programmation fœtale, nous avons tenté de révéler d'éventuelles altérations d'expression génique, en plaçant les rats FR30 sous un régime HF dès leur sevrage. Cependant, le régime HF n'a pas accentué les faibles altérations d'expressions visibles sous régime standard chez les rats FR30. Il semblerait donc que, dans notre modèle, l'expression génique de l'hypothalamus soit peu affectée par la DM. Nos résultats sont cependant, en accord avec l'hypothèse du « *thrifty phenotype* », selon laquelle, le fœtus, dans un environnement intra-utérin délétère, mettrait en place des réponses adaptatives pour favoriser la croissance d'organes clés. Le cerveau se développerait donc au détriment d'autres organes périphériques. Ce concept, appelé « *brain sparing effect* », stipule qu'une redistribution des réserves énergétiques s'opère dans un environnement délétère, créant un ralentissement du développement de la périphérie, pour que le cerveau puisse poursuivre normalement sa croissance (Lumbers *et al.*, 2001).

Il est toutefois important de rappeler que les qRT-PCR arrays utilisés ne comportent que 84 gènes. Nous ne pouvons donc exclure que d'autres gènes impliqués dans la régulation de la balance énergétique, ou dans d'autres grandes fonctions physiologiques telles que la plasticité des connexions neuronales, soit modulés dans notre modèle. De plus, les analyses géniques sont menées sur l'hypothalamus total. Il est donc possible que l'expression de certains des gènes testés soit modulée différemment en fonction des noyaux de l'hypothalamus, mais que l'expression génique globale soit la même que celle observée chez les T.

Par ailleurs, la POMC pourrait également être une cible privilégiée de la régulation épigénétique par la DM (Stevens *et al.*, 2011). Ces altérations pourraient être à l'origine de variations de la prise alimentaire et de la dépense énergétique chez l'adulte. Nous ne pouvons donc exclure que la DM entraîne des altérations épigénétiques dans notre modèle FR30.

Bien que, globalement, peu de variations de l'expression génique soient visibles dans l'hypothalamus, on ne peut exclure que le régime HF puisse entraîner des altérations de l'architecture des projections des neurones du NA. En effet, chez le rat, la descendance mâle issue de mères ayant reçu un régime induisant l'obésité, sous régime HF ou non, durant la

gestation et la lactation, présente un nombre réduit des connexions à POMC du NA, qui persiste à l'âge adulte (Bouret *et al.*, 2008). Ces altérations seraient dues à une diminution de l'action neurotrophique de la leptine durant le développement postnatal. Une autre étude a également montré que, dans une population de rats mâles nourris dès le sevrage avec un régime HF, ceux qui développent un phénotype d'obésité à 14 semaines présentent une diminution du nombre de neurones à POMC dans le NA (Tian *et al.*, 2004). Cette diminution de la réponse anorexigène entraîne une hyperphagie, qui serait, en partie, à l'origine du phénotype d'obésité observé chez ces animaux. Il semblerait donc, que le régime HF induise des perturbations dans le réseau de connexions neuronales de l'hypothalamus. Les FR30 présentant une perturbation de la réponse des neurones à POMC suite à un jeûne de 48 heures, il serait intéressant d'étudier leur réponse au régime HF à l'aide de la technique d'immunohistochimie en marquant spécifiquement les projections à α -MSH du NA vers les autres noyaux de l'hypothalamus, notamment vers le NPV, et d'évaluer leur densité.

L'absence de « *catch-up* » précoce protégerait donc le système nerveux central, et tout particulièrement l'hypothalamus, de possibles altérations structurales et de modifications importantes de l'expression génique. Cependant, le bienfondé de cette hypothèse est remis en cause par une étude portant sur l'impact du « *catch-up* » suite à une RPM. Une RPM durant la gestation et la lactation, induit une croissance réduite du nouveau-né, qui s'avère délétère (Coupé *et al.*, 2010). La descendance présente en effet, des altérations de la mise en place des réseaux hypothalamiques qui seraient la conséquence d'une malnutrition postnatale, à l'origine d'une diminution des concentrations plasmatiques de leptine, ou d'autres facteurs neurotrophiques, durant le stade néonatale.

B. La situation incertaine de la périphérie

Comme décrit dans d'autres modèles de DM, les rats FR30 présentent une hyperleptinémie (Vickers *et al.*, 2000 ; Guan *et al.*, 2005). Cependant, contrairement aux études citées, les rats FR30 de notre modèle ne montrent pas de phénotype d'obésité ni d'augmentation importante de la masse des TA périrénaux ou périgonadiques.

Le taux de leptine circulant est souvent défini comme le reflet de l'adiposité, c'est-à-dire qu'il est proportionnel à la masse du TA. Cependant il semblerait que dans notre

modèle FR30, le taux de leptine circulant ne soit pas uniquement relatif à cette masse, ni à la taille des adipocytes. Il est possible que la leptine soit produite par d'autres tissus périphériques comme le muscle (pour revue Münzberg, 2008). En accord avec nos données, une étude a montré que des souris mâles KO pour le récepteur aux androgènes uniquement au niveau du TA, présentent une hyperleptinémie, associée à une augmentation du niveau d'expression de son messager, sans phénotype d'obésité. Les auteurs démontrent que la testostérone et/ou la dihydrotestostérone, après liaison au récepteur aux androgènes, inhibent l'activité transcriptionnelle du gène codant la leptine au niveau du TA (Yu *et al.*, 2008). Or, il a été montré au sein du laboratoire, que la DM périnatale altère l'axe gonadotrope, en retardant l'apparition de la puberté et en diminuant le poids des testicules (Léonhardt *et al.*, 2003). Ainsi, une altération du taux de testostérone, et/ou de son action au niveau du TA, pourrait participer, au moins en partie, à l'hyperleptinémie observée chez les rats FR30. Un dosage de la testostérone et de ses métabolites actifs circulants devrait permettre répondre à cette question.

De plus, les différents dépôts de TA étant prélevés par dissection, ils ne reflètent sans doute pas la totalité de la masse adipeuse du rat. Il serait intéressant de réaliser des mesures à l'aide de la méthode d'IRM, qui donneraient une valeur plus précise de la proportion exacte de TA de l'animal, et en permettraient la localisation. Enfin, bien que les adipocytes ne semblent pas présenter d'hypertrophie significative, on ne peut exclure que la DM programme une dédifférenciation ou une hyperplasie des adipocytes chez la descendance (Zhang *et al.*, 2007).

La DM périnatale modifie également la sécrétion d'insuline. En effet, les rats FR30 présentent une hyperinsulinémie en condition *ad libitum*, sans modulation de la glycémie. Cette hyperinsulinémie pourrait être le reflet de la période postprandiale décalée, mais pourrait également traduire un état précoce de résistance à l'insuline. Cette élévation du taux d'insuline est également retrouvée chez des patients obèses (Hamed *et al.*, 2011). Or, la résistance précoce à l'insuline commence par une augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques, dans le but de maintenir l'euglycémie (Hamed *et al.*, 2011). Si elle n'est pas maîtrisée, l'hyperinsulinémie conduit à un épuisement des cellules β -pancréatiques qui produiront alors moins d'insuline. L'hypoinsulinémie qui en résulte entraînera une hyperglycémie, qui peut, à long terme, aboutir à un diabète de type 2. Il est donc possible que l'hyperinsulinémie des animaux FR30 traduise un stade pré-diabétique.

Associée à l'hyperleptinémie, l'hyperinsulinémie peut suggérer une altération du rétro-contrôle de l'axe adipo-insulaire (Vickers *et al.*, 2001). En effet, l'augmentation de la leptine dans notre modèle FR30 pourrait être un phénomène compensatoire visant à réduire la surproduction d'insuline. Ce mécanisme aurait pour but de retarder l'apparition d'un diabète de type 2.

Nous avons également observé une intolérance au glucose lorsque les rats FR30 sont soumis à une IPTT, mais pas dans le cas d'une OGTT. Ces résultats peuvent refléter une perturbation de l'absorption intestinale des rats FR30. Des études ont démontré un important rôle des glucocorticoïdes, en synergie avec d'autres hormones, comme l'insuline, dans la maturation de l'intestin (Moog, 1979). En effet, ils inhibent la croissance de l'intestin, en augmentant le catabolisme (Burrin *et al.*, 1999). Or, les animaux FR30 adultes présentent une perturbation de l'axe corticotrope induisant une hypercorticostéronémie. Il se pourrait donc que leur intestin montre des perturbations de son développement, de sa maturation et de sa fonctionnalité.

La DM ne semble donc pas induire d'altérations marquées de la régulation du métabolisme énergétique dans notre modèle, contrairement aux résultats du modèle FR30 décrit par Vickers. Il serait cependant intéressant de laisser vieillir les rats jusque 8 mois, afin de voir si l'hyperleptinémie et l'hyperinsulinémie observées, évoluent vers un phénotype pathologique.

Nous avons ensuite décidé de challenger notre modèle en mettant les animaux FR30 sous régime HF dès le sevrage. Cependant, à notre grande surprise, ce régime n'amplifie pas les altérations induites par la DM en régime standard. Les résultats obtenus sont donc en désaccord avec ceux de Vickers (Vickers *et al.*, 2000). Cette différence de résultats pourrait venir du fait que, dans le modèle de Vickers, les rats issus de mères dénutries sont adoptés par des femelles sous régime *ad libitum*. Dans cet environnement postnatal riche, comparé à l'environnement intra-utérin, leurs rats présentent un « catch-up » rapide et précoce qui serait à l'origine des altérations métaboliques observées. En effet, de nombreuses études ont montré l'importance de la qualité de la lactation dès le stade néonatal et, par conséquent, l'importance de la vitesse de croissance, dans la prévalence de pathologies métaboliques induites par la DM (Codo and Carlini, 1979 ; Bieswal *et al.*, 2006). Suite à une restriction calorique ou protéique durant la gestation, le régime hypercalorique postnatal, par diminution

de la taille de la portée, induit un « *catch-up* » précoce chez la descendance qui présente, à l'âge adulte, une hyperphagie, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et une hypertrophie des adipocytes. Les expériences d'adoptions croisées ont également confirmé cette hypothèse (Desai *et al.*, 2007a). En effet, suite à une DM de 50 % dès le 10^{ème} jour de gestation, les nouveau-nés adoptés par des femelles nourries *ad libitum* présentent une obésité ainsi qu'une résistance à l'insuline.

Dans notre modèle, les nouveau-nés FR30 ne connaissent pas de changements brutaux de leur environnement nutritionnel. En effet, comme précédemment suggéré, le lait subirait un enrichissement progressif de sa composition. Cette transition en douceur permettrait aux animaux FR30 de mettre en place des mécanismes de régulation métabolique des organes périphériques, afin de répondre au mieux à ce nouvel environnement nutritionnel extra-utérin. Cette adaptation protégerait les rats FR30 adultes de l'apparition de pathologies liées au métabolisme.

Il serait toutefois intéressant d'effectuer des adoptions croisées avec des mères nourries *ad libitum* pour mesurer l'impact de la lactation dans notre modèle. Des expériences de rats « *pup in a cup* », nous permettrait également de moduler sélectivement la composition du lait des nouveau-nés, et d'apprécier le rôle de certains nutriments, ou de leur cinétique d'apparition, dans notre modèle.

Il est également important de noter que notre régime HF ne contient pas de carbohydrates appétents pour l'animal. Or, l'appétence semble importante dans le développement de l'hyperphagie et de l'obésité (Bayol *et al.*, 2008). Ce facteur pourrait donc être limitant dans notre étude. De plus, ce régime commercial est fabriqué à façon : l'ajout de lipides nécessite donc une déplétion en d'autres nutriments. Il se pourrait donc que notre régime HF entraîne des carences en nutriments chez nos animaux, perturbant leur développement, ce qui expliquerait que les rats T prennent moins de poids sous régime HF que ceux de l'étude de Vickers (Vickers *et al.*, 2000). De plus, selon l'hypothèse du « *thrifty phenotype* », les rats FR30 ont adapté leur développement à un environnement hypocalorique ce qui pourraient se révéler délétères en cas de diminution de certains nutriments et masquer l'effet HF.

Le métabolisme des acides gras fonctionne comme un capteur de la disponibilité en nutriments au niveau de l'hypothalamus. Les acides gras à longue chaîne, dont l'acide

oléique, sont plus particulièrement perçus comme un signal d'abondance en nutriments (López *et al.*, 2005b). Ils diminuent en effet, l'expression génique du NPY et de l'AgRP, dans l'hypothalamus, et donc la prise alimentaire (Obici *et al.*, 2002b). Une autre étude a également montré que l'acide oléique stimule spécifiquement les neurones à POMC (Jo *et al.*, 2009). En effet, l'acide oléique, en augmentant la β -oxydation des lipides dans les mitochondries, inactive les canaux potassiques dépendants de l'ATP, créant ainsi une dépolarisation des neurones à POMC. Cette dépolarisation entraîne une stimulation de l'activité électrique des neurones à POMC, et donc, une augmentation de leur activité anorexigène. Étant donné que le système POMC est une cible privilégiée de la programmation foetale suite à la DM dans notre modèle, il serait intéressant d'étudier la répercussion du régime HF sur l'activité de ces neurones et leur implication sur l'effet anorexigène chez l'adulte.

Enfin, il est possible que des cytokines, autres que la leptine, soient modulées chez les animaux FR30. Il serait donc intéressant de doser entre autre le TNF α ou l'Interleukine 6 (IL6). En effet, le TNF α , une cytokine pro-inflammatoire, est augmenté en cas d'obésité chez les rongeurs. Or, plusieurs études ont montré que l'hyperleptinémie est associée à une augmentation de la réponse pro-inflammatoire observée lors d'un phénotype d'obésité (Van Dielen *et al.*, 2001). Chez la souris, la leptine contrôlerait soit directement la production de TNF α (Loffreda *et al.*, 1998), soit *via* l'action d'une autre cytokine produite par le TA, comme l'IL6 qui est capable d'induire le TNF α dans les macrophages. Le TA produit également de l'IL6 qui est augmentée en cas d'obésité (Mohamed-Ali *et al.*, 1997 ; Fried *et al.*, 1998). L'IL6 est une cytokine multifonctionnelle qui agit sur de nombreuses cellules et tissus dont l'hypothalamus (pour revue Van Snick, 1990). Plusieurs travaux ont mis en évidence une corrélation entre la quantité d'IL6 dans le TA et sa concentration circulante ainsi que celle de la Protéine C Réactive (PCR) (Bastard *et al.*, 2000) (Bastard *et al.*, 2000). Il est maintenant bien établi, que l'élévation de la PCR est un important marqueur de risque cardiovasculaire (Ridker, 2003). Ces données suggèrent donc un rôle central de l'IL6 dans l'association entre obésité, inflammation et pathologies cardiovasculaires (Yudkin *et al.*, 2000).

D'autre part, de nombreuses études ont démontré l'existence d'interactions entre les voies de signalisation des cytokines et celle de l'insuline. En effet, le TNF α et l'IL6 sont capables de diminuer l'action de l'insuline en bloquant à différents niveaux sa voie de

transduction intracellulaire (Grimble, 2002). L'augmentation chronique de leur concentration circulante pourrait donc induire une insulino-résistance (Hotamisligil *et al.*, 1993).

Pour la périphérie, tout comme pour l'hypothalamus, l'absence de « *catch-up* » précoce semble protéger les animaux FR30 de l'apparition de pathologies métaboliques. D'autres études s'orientent vers la même hypothèse. En effet, l'absence de « *catch-up* » dans un modèle de restriction protéique durant la gestation et les 2 premières semaines de lactation chez le rat, augmente la sensibilité à l'insuline chez la descendance à l'âge adulte (Lim *et al.*, 2011).

Sous régime standard, le TA des animaux FR30 présente une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la lipogénèse et l'adipogénèse. Cette modulation est différente en fonction de la localisation des dépôts de TA, ce qui montre que la DM programme spécifiquement les différents dépôts adipeux. Ces résultats suggèrent que les rats FR30 seraient programmés pour favoriser le stockage de lipides dans le TA, ce qui se traduit par une tendance à l'hypertrophie des adipocytes. Une fois de plus, nos travaux sont en accord avec l'hypothèse du « *thrifty phenotype* », ce qui explique cette capacité à stocker plus facilement des réserves de lipides, afin de répondre aux besoins d'une nouvelle dénutrition. De plus, des études indiquent que le RCIU, induit par une carence protéique, favorise l'adiposité viscérale ainsi que l'expression de PPAR γ dans ce tissu chez la descendance mâle adulte, avant l'installation du phénotype d'obésité (Ozanne *et al.*, 2001). Ainsi, les perturbations géniques observées dans notre modèle pourraient refléter un stade très précoce du développement de l'obésité.

L'effet du régime HF sur la prise de poids est plus marqué chez les animaux FR30. Ce résultat associé à une hyperleptinémie, renforce l'hypothèse selon laquelle les animaux FR30 seraient prédisposés à l'adiposité. De façon étonnante, ce régime diminue l'expression des gènes impliqués dans la lipogénèse et l'adipogénèse de manière dépôts de TA-spécifique, chez les rats FR30 comparée aux animaux T. Ceci suggère une réponse adaptative qui protégerait de l'accumulation de TA dans un environnement riche en lipides. En effet, les rats FR30 ne présentent pas d'hypertrophie plus importante du TA par rapport aux animaux T sous régime HF. Chez les personnes obèses, on observe également, une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la lipogénèse, ce qui les protégerait d'un développement trop important et trop rapide du TA (Ortega *et al.*, 2010).

L'ensemble des altérations géniques observées suggère que la DM altère le stockage des lipides à long terme dans notre modèle et potentiellement la mise en place du TA, durant le développement fœtal et postnatal précoce.

Dans un modèle FR30 avec adoption par des mères nourries *ad libitum*, la descendance ne présente pas d'altérations de l'expression génique du TA à 55 jours (Morris *et al.*, 2009). À 110 jours, ces animaux développent des altérations métaboliques liées au SM, telles qu'une perturbation de la sensibilité à la leptine, qui ne peuvent s'expliquer par le profil d'expression génique du TA à 55 jours. Il semblerait que dans ce modèle, les altérations physiologiques proviennent d'une perturbation de l'oxydation des lipides par le foie et de la fonction mitochondriale. Les lipides s'accumuleraient préférentiellement dans le foie, empêchant ainsi l'expansion du TA. Ce phénomène de stockage des triglycérides est appelé stéatose hépatique. Une autre étude a montré que la RPM chez le rat durant la gestation, induit également une stéatose hépatique chez la descendance mâle adulte (Erhuma *et al.*, 2007). De plus, l'augmentation du récepteur à l'adiponectine AdipoR2 dans le foie, est associée à une augmentation de la β -oxydation des acides gras, et réduit la concentration de triglycérides circulants (Kadowaki and Yamauchi, 2005). Les variations de l'expression du récepteur AdipoR2, pourraient donc être impliquées dans les mécanismes mis en jeu lors du développement de la stéatose hépatique. Or, nous avons observé une augmentation de la concentration d'adiponectine chez les rats FR30 sous régime HF. Il se pourrait donc que cette augmentation d'adiponectine favorise le stockage de lipides au niveau du foie via son récepteur AdipoR2 dans notre modèle. L'analyse du profil d'expression génique du foie devrait permettre une meilleure compréhension de la régulation du métabolisme lipidique chez les rats FR30 et ouvrir de nouvelles voies de recherche.

Il se pourrait également que les animaux FR30 soient à une période charnière du développement de pathologies liées au SM. Il serait donc intéressant de mener la même étude sur des animaux à 6, 8 et 12 mois, afin d'établir une cinétique de l'expression génique du TA.

Fort de l'ensemble de ses premiers résultats, le laboratoire a lancé des analyses transcriptomiques à grande échelle, à l'aide de microarrays contenant 25 000 gènes, sur deux dépôts de TA blanc, le TA brun, mais également le foie, le muscle soleus et l'hypothalamus.

II. Les rats FR30 sont-ils résistants à la leptine ?

L'hyperleptinémie observée chez les animaux FR30 pourrait refléter un éventuel état de résistance centrale à la leptine (Vickers *et al.*, 2000). Plusieurs résultats de notre étude semblent en effet, étayer cette hypothèse :

- malgré l'hyperleptinémie, nous n'avons pas observé de modulations du niveau des niveaux d'expression du NPY ni de la POMC, cibles centrales de la leptine.
- l'augmentation chronique de la concentration en leptine inhibe l'axe corticotrope (Heiman *et al.*, 1997). Cependant, les rats FR30 présentent une hypercorticostéronémie.
- la diminution de l'expression du récepteur à la leptine pourrait refléter un phénomène de désensibilisation, prémice d'une résistance (Münzberg *et al.*, 2005).
- l'augmentation de l'expression du récepteur à l'insuline dans l'hypothalamus suggère une augmentation de sa signalisation centrale qui pourrait influencer la sensibilité à la leptine (Plum *et al.*, 2006).

Les rats FR30 semblent également présenter des perturbations de l'action périphérique de la leptine. En effet, comme nous avons pu l'observer au niveau de l'hypothalamus, l'expression du récepteur Ob-Rb est diminuée dans le TA. De plus, malgré l'action anti-lipogénique de la leptine sur le TA, sous régime standard, nous avons observé une augmentation de l'expression des enzymes clés impliquées dans la lipogénèse telles que l'ACC et la FAS.

Nous avons alors cherché à déterminer l'efficacité de la leptine sur le TA, en évaluant le rapport protéique STAT3 phosphorylé/STAT3. En dépit de l'hyperleptinémie, les rats FR30 présentent une diminution de STAT3 phosphorylé dans le TA, traduisant une diminution de l'efficacité de la transduction du signal de la leptine dans ce tissu, prémice d'une résistance à la leptine. Une diminution de la phosphorylation de STAT3 est également observée au niveau de l'hypothalamus de la descendance adulte, dans un modèle de DM de 50 % chez le rat, dès le 10^{ème} jour de la gestation jusqu'au sevrage (Desai *et al.*, 2007b). Cette diminution de la

fonction anorexigène contribuerait au développement du phénotype d'obésité observé dans ce modèle.

Afin d'exacerber ces traits et de tenter de faire basculer les animaux FR30 vers un état déclaré de résistance à la leptine, nous les avons soumis à un régime HF dès le sevrage. De manière très surprenante, les rats FR30 présentent une forte diminution de l'expression de l'ACC et de la FAS dans le TA ainsi qu'une augmentation de l'expression de Ob-Rb dans le TA épидидymal. Ces données sont à associer avec une augmentation de la phosphorylation de STAT3 dans le TA et suggèrent que le régime HF favorise l'action anti-lipogénique de la leptine sur le TA dans notre modèle de DM. Les rats FR30 auraient donc développé des mécanismes adaptatifs les protégeant d'un développement excessif du TA dans un environnement obésogène. Il est également possible que ces mécanismes ne soient que temporaires, et qu'ils soient mis en place dans le but de retarder l'apparition d'un état d'obésité associé à une résistance à la leptine.

Bien que notre étude ne permette pas de conclure quant à une réelle résistance à la leptine, elle suggère que la sensibilité à cette hormone est modifiée chez les rats FR30 adultes. De plus, les différences observées dans l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides, ainsi que celles du niveau de STAT3 phosphorylé dans le TA, traduisent une sensibilité différente de l'action de la leptine en fonction des dépôts adipeux chez le rat FR30.

Des injections ICV de leptine permettraient d'évaluer la sensibilité à la leptine au niveau de l'hypothalamus, en quantifiant le niveau de phosphorylation de STAT3. Le même type d'expérience réalisée avec des injections IP permettrait d'évaluer la résistance périphérique, mais également le transport de la leptine vers l'hypothalamus.

Cependant, la leptine n'est pas la seule cytokine qui emprunte la voie STAT3 dans l'adipocyte. En effet, l'IL6 et la GH, entre autres, sont également capables de l'activer. Le signal détecté de la phosphorylation de STAT3 dans le TA n'est peut être donc pas le réel reflet de l'activité de la leptine sur son récepteur. La leptine est cependant capable d'activer d'autres voies de signalisation dont celle des MAP kinases *via* la phosphorylation de *Extracellular signal-Regulated Kinases* (ERK) (Kim *et al.*, 2000 ; Banks *et al.*, 2000). Il serait donc intéressant d'étudier le niveau de phosphorylation de ERK, par Western blot, dans le TA

mais également au niveau de l'hypothalamus. Cette expérience devrait nous permettre de mieux appréhender la sensibilité à la leptine.

De plus, l'activation du complexe STAT3 phosphorylé, par la fixation de la leptine sur son récepteur, entraîne le recrutement de facteurs exerçant un rétro-contrôle négatif sur son activité, comme le *Suppressor Of Cytokine Signalling 3* (SOCS3) ou la *Protein Tyrosine Phosphatase 1B* (PTP1B).

SOCS3 est une protéine qui inhibe le signal induit par les cytokines (Diamond *et al.*, 2000). Il contient en effet, un domaine SH2 d'interaction protéine-protéine qui lui permet de se fixer sur les protéines JAK phosphorylées ou directement sur les tyrosines phosphorylées du récepteur, inhibant ainsi leur activité (Krebs and Hilton, 2000). SOCS3 pourrait être impliqué dans la résistance à la leptine. En effet, des études ont montré une augmentation de SOCS3 dans le TA, mais également dans l'hypothalamus de rats souffrant d'obésité associée à une résistance à la leptine (Pérez *et al.*, 2004 ; Gu *et al.*, 2009 ; Trotta *et al.*, 2011 ; Rodrigues *et al.*, 2011).

PTP1B est une protéine phosphatase qui se fixe sur les protéines JAK ce qui entraîne leur déphosphorylation, à l'origine de l'inhibition du signal de la leptine (Kaszubska *et al.*, 2002). L'expression de PTP1B est également augmentée chez le rat résistant à la leptine (Morrison *et al.*, 2007). De plus, les animaux KO pour PTP1B, uniquement au niveau des neurones à POMC, montrent une sensibilité accrue à la leptine et sont résistants à la prise de poids sous régime HF (Banno *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent l'implication de PTP1B dans les mécanismes de résistance à la leptine.

L'analyse de la présence et de la quantification de l'ARNm par RT-qPCR, et de la protéine par Western blot de SOCS3 et PTP1B, apporterait des informations complémentaires quant à un éventuel état de résistance à la leptine dans notre modèle FR30.

Cependant, il est important de rappeler que le récepteur Ob-Rb est largement distribué dans l'organisme, suggérant une action de la leptine sur d'autres organes que le TA ou l'hypothalamus, ainsi qu'une sensibilité différente en fonction des tissus. Une étude sur la souris agouti obèse, supposée résistante à la leptine, a en effet, montré que, bien que la leptine diminue moins la prise alimentaire et la prise de poids chez ces animaux que chez la souris T, son action sur l'activité du nerf sympathique est la même dans les deux groupes (Correia *et*

al., 2002). Ces résultats supportent l'hypothèse de l'existence d'une résistance sélective à la leptine en périphérie. De plus, la souris subissant un régime induisant l'obésité pendant 10 semaines, présente une hyperleptinémie associée à une résistance à l'action métabolique de la leptine, mais ne montre pas d'altération de l'action de la leptine sur la fonction rénale ou de la pression artérielle (Rahmouni *et al.*, 2005). Il semblerait donc que la résistance périphérique à la leptine puisse également être tissu-spécifique. Le même phénomène peut également avoir lieu au niveau central. En effet, dans un modèle similaire, il semblerait que seul le NA soit atteint d'une résistance à la leptine (Münzberg *et al.*, 2004).

Il serait donc intéressant d'étendre notre étude à d'autres dépôts TA, tels que le TA viscéral ou le TA sous-cutané, mais également à d'autres organes comme le muscle. En effet, la quantification du taux de phosphorylation de l'AMPK par Western blot, nous permettrait d'évaluer la sensibilité à la leptine du muscle. Enfin, bien que nous n'ayons observé que de subtiles altérations des neurones à POMC et à NPY du NA, nous ne pouvons exclure que d'autres neurones de l'hypothalamus présentent une réponse et une sensibilité différentes à l'hyperleptinémie observée dans notre modèle.

Ces diverses altérations pourraient également refléter un seuil d'activation par la leptine différent chez les rats FR30. En effet, l'hypothèse du « *thrifty phenotype* » suggère que le fœtus ajuste le niveau d'activité de certaines fonctions physiologiques en cas d'environnement intra-utérin délétère. Ainsi, l'hyperleptinémie pourrait être la conséquence d'une programmation fœtale en réponse à un apport calorique réduit durant la gestation. En effet, les rats FR30 ont pu développer une réponse adaptative se traduisant par une diminution de leur seuil d'activation du signal de la leptine au niveau de l'hypothalamus et du TA. Ces modulations éviteraient une activation constitutive, voire une saturation, du système de régulation de la prise alimentaire et donc protégeraient de la résistance à la leptine.

III. Les glucocorticoïdes : cause ou conséquence de la programmation fœtale ?

Les rats FR30 présentent à 4 mois une hypercorticostéronémie en condition basale. Cependant, suite à un stress induit par un jeûne de 16 heures ou un régime HF, les animaux FR30 ne montrent pas d'augmentation de la concentration de corticostérone, contrairement aux T. La sensibilité aux glucocorticoïdes serait donc modifiée chez les animaux FR30. Ce résultat est en accord avec d'autres études menées au laboratoire qui montrent que la DM périnatale de 50 % altère le fonctionnement de l'axe corticotrope chez les rats FR50, ce qui se traduit par une hypersécrétion de glucocorticoïdes à l'âge adulte (Sebaai *et al.*, 2004 ; Lesage *et al.*, 2006 ; Vieau *et al.*, 2007). Cette altération est retrouvée dans plusieurs modèles de stress maternels présentant des pathologies associées au SM (pour revue Vuguin, 2007 ; Weinstock, 2008). Il semblerait donc que la DM programme l'axe corticotrope qui devient alors incapable de répondre à une situation de stress.

Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, les animaux FR30 présentent une altération des connexions des neurones à POMC suite à un jeûne de 48 heures, ce qui refléterait une adaptation de leur réponse au jeûne. Les rats FR30 étant programmés pour s'adapter à un environnement pauvre en nutriments, il est possible que cette situation soit moins stressante pour eux que pour les rats T, ce qui pourrait expliquer l'absence de modulation de la concentration de corticostérone.

De plus, nous avons montré que la DM module l'expression de facteurs impliqués dans la sensibilité aux glucocorticoïdes et ce de manière tissu adipeux-spécifique. Nous avons tout particulièrement observé une augmentation de l'expression génique de la 11 β -HSD2 dans le TA suite à un régime HF. Or la surexpression de la 11 β -HSD2 est connue pour protéger la souris de l'installation du phénotype d'obésité induit par un régime HF (Kershaw *et al.*, 2005). *A contrario*, l'augmentation de la sensibilité aux glucocorticoïdes dans le TA stimule l'adipogénèse. En effet, chez la souris la surexpression de la 11 β -HSD1 dans le TA entraîne une obésité viscérale (Masuzaki *et al.*, 2001). L'augmentation de l'expression de la 11 β -HSD2 pourrait donc limiter la concentration de corticostérone dans le TA des rats FR30, ce qui diminuerait leur réponse aux glucocorticoïdes. Les rats FR30 semblent donc adapter leur

sensibilité aux glucocorticoïdes pour empêcher le dépôt d'un excès de TA suite à un régime HF (Milagro *et al.*, 2007).

Les effets liés au stress ou à la malnutrition semblent intimement liés. En effet, la DM programme l'axe HHS impliqué dans la réponse au stress (pour revue Vieau, 2009), mais les stress périnataux modifient le comportement alimentaire (Lesage *et al.*, 2004). Il est donc difficile de différencier les effets de ces deux facteurs. L'injection de DEX chez le rat entraîne un petit poids de naissance, une intolérance au glucose et de l'hypertension chez la descendance adulte. Or, la DM induit les mêmes altérations. Ces deux types de modèles induisent également une hyperactivité chronique de l'axe HHS ainsi qu'une hypercorticosité chez l'adulte. De plus, le lait des mères stressées par la dénutrition, peut présenter une augmentation de la concentration en corticostérone, qui pourrait participer à la programmation fœtale (Lau, 1992).

Il a également été montré au laboratoire que la DM de 50 % du modèle FR50, module le rapport de l'expression des récepteurs MR et GR et augmente l'expression de la 11 β -HSD1 dans l'hippocampe, mais pas dans l'hypothalamus (Dutriez-Casteloot *et al.*, 2008). De plus, l'expression du récepteur MR, ainsi que de la 11 β -HSD1 et de la 11 β -HSD2, est fortement augmentée dans l'hypophyse des rats FR50. Ces travaux montrent que la DM programme à long terme l'expression de gènes impliqués dans la sensibilité aux glucocorticoïdes dans le cerveau. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de ces gènes au niveau central dans notre modèle.

Des expériences complémentaires sur l'activité de la 11 β -HSD1 et de la 11 β -HSD2 ainsi que celle des récepteurs MR et GR dans le TA et au niveau de l'hypothalamus, seraient nécessaires à la compréhension du réel impact de la DM sur la sensibilité aux glucocorticoïdes. La technique de « *binding* » ou de quantification de liaison, nous permettrait d'établir l'efficacité de liaison des récepteurs MR et GR. Il serait également intéressant de doser l'activité enzymatique de la 11 β -HSD1 et de la 11 β -HSD2. L'incubation de la 11 β -HSD1 avec de la corticostérone marquée, ainsi que du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP), co-facteur spécifique de l'enzyme, nous permettrait de mesurer, par la technique de Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP), la quantité de déhydrocorticostérone marquée obtenue. Le même type d'expérience avec le NAD, nous renseignerait sur l'activité de la 11 β -HSD2.

Il serait également intéressant d'étudier les conséquences de l'ajout d'un stress chronique ou ponctuel, tel que la contention, dans notre modèle de DM, afin de tenter d'évaluer le réel effet des glucocorticoïdes.

IV. La dénutrition maternelle induit-elle une perte du rythme circadien ?

A. Régulation physiologique du rythme circadien

L'ensemble des organismes vivants est soumis à des changements cycliques exogènes appelés Zeitgebers (ZT), ou synchroniseurs, tels que les saisons ou l'ensoleillement sur 24 heures. Des adaptations à ce type de variations permettent à l'organisme d'anticiper les fluctuations environnementales et d'optimiser la relevance de ses mécanismes biologiques. De nombreuses fonctions physiologiques biochimiques et hormonales, telles que la thermorégulation, la prise alimentaire, la pression artérielle ou les concentrations plasmatiques de leptine, d'adiponectine, d'insuline et de lipides, montrent une variation sur 24 heures qualifiée de rythme circadien (Ando *et al.*, 2009). Les variations de ces facteurs endogènes dépendent de facteurs exogènes. Le contrôle du rythme circadien est complexe et implique une régulation à la fois par une horloge centrale principale, mais également par des horloges périphériques secondaires. L'horloge centrale située au niveau du noyau supra-chiasmatique (NSC), est sous l'influence de la lumière. Les horloges secondaires sont principalement localisées au niveau du TA, du foie, du cœur et du pancréas (Schibler *et al.*, 2003). Elles sont synchronisées par des facteurs neurohormonaux, tels que la prise alimentaire (pour revue Bray and Young, 2007). Bien que les mécanismes reliant les horloges centrales et périphériques ne soient pas entièrement connus, ils semblent impliquer des hormones notamment celles intervenant dans la régulation de la balance énergétique (McNamara *et al.*, 2001). Les glucocorticoïdes sembleraient également être de bons candidats dans ce dialogue de par leur sécrétion rythmique et leur capacité à décaler les horloges périphériques secondaires (Balsalobre *et al.*, 2000). En effet, il a été montré que l'exposition du cerveau foetal au cours du développement à un excès de glucocorticoïdes provenant de la mère dénutrie durant la gestation, peut conduire à une hyperactivité ainsi qu'une désynchronisation de l'axe corticotrope et des rythmes circadiens chez la descendance (Maccari *et al.*, 2003 ; Son *et al.*, 2011).

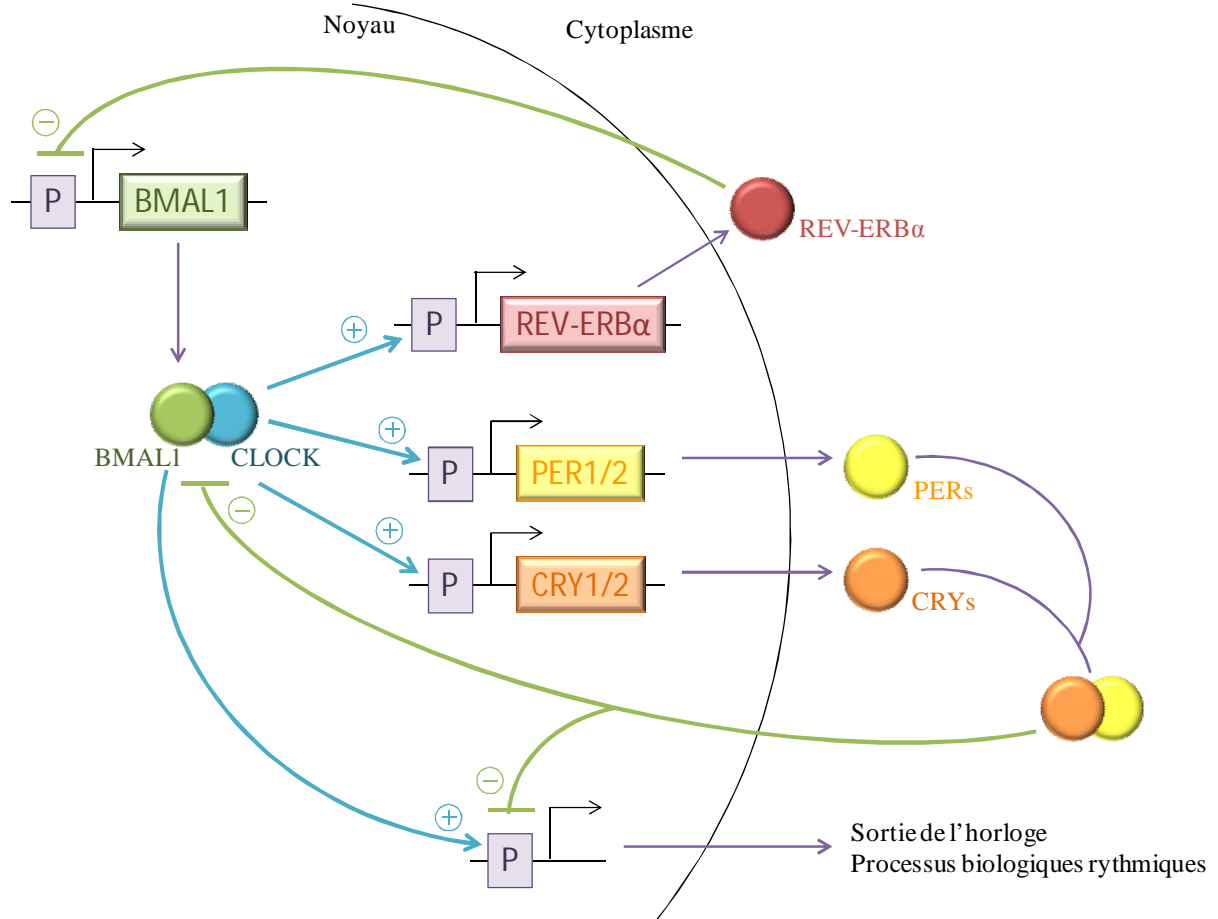


Figure 24 : Schéma de la boucle de régulation du rythme circadien dans le noyau suprachiasmatique. D'après Ko and Takahashi (2006). Flèche bleue : stimulation ; Flèche verte : inhibition ; P : promoteur

Au niveau cellulaire, les horloges endogènes sont contrôlées par de nombreux gènes d'horloge dont : *Period circadian protein homolog 1* (PER1), PER2, PER3, *Brain and muscle Arnt-like protein 1* (BMAL1), *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (CLOCK), cryptochrome (CRY1), CRY2 et REV-ERB α (Ko and Takahashi, 2006). Les connaissances actuelles conduisent à un modèle de rythmicité circadienne basé sur des boucles d'autorégulation (Dardente and Cermakian, 2007). Au cœur de ce mécanisme, les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1 se dimérisent et activent la transcription d'autres gènes d'horloge dont PER, CRY et REV-ERB α . Les protéines PER et CRY forment ensuite des complexes qui subissent une translocation nucléaire et inhibent en retour l'activation transcriptionnelle de l'hétérodimère CLOCK-BMAL1. Cette répression du complexe CLOCK-BMAL1 inhibe l'expression des gènes PER et CRY (Figure 24). Cette boucle de régulation se fait sur 24 heures et est à l'origine du rythme circadien de l'organisme. En effet, l'inactivation du complexe PER/CRY est considérée comme critique au démarrage d'un nouveau cycle d'autorégulation.

B. Rythmes circadiens et métabolisme

Des pathologies liées au SM, telles que le diabète de type 2 ou l'obésité, peuvent être associées à des perturbations physiologiques du rythme circadien chez l'Homme (Van Cauter *et al.*, 1997). Ces variations peuvent entraîner des perturbations permanentes de la fonction des organes (Kaneko *et al.*, 2009). En effet, l'amplitude du rythme d'expression génique de la leptine est diminuée chez les patients obèses (Saad *et al.*, 1998). Le concept selon lequel une désynchronisation chronique du cycle veille/sommeil, et des rythmes circadiens en général, favoriserait la surcharge lipidique est appelé chronobésité (Mendoza *et al.*, 2008). L'expression génique de C/EBP α , impliqué dans la différenciation adipocytaire, présente un rythme circadien dans le TA de la souris. Ce facteur pourrait donc potentiellement être impliqué dans le lien entre perturbation du rythme circadien et apparition de l'obésité. De plus, le gène d'horloge REV-ERB α agit comme un facteur adipogène en facilitant l'expression des cibles de PPAR γ dans des lignées cellulaires de préadipocytes (Fontaine *et al.*, 2003).

Des souris KO pour le gène CLOCK présentent un phénotype d'obésité associé à une hyperleptinémie ainsi qu'une hyperinsulinémie (Turek *et al.*, 2005). Bien que l'hypothèse de l'implication des gènes d'horloge dans le développement de l'obésité soit récente, les premières études semblent indiquer que des altérations du rythme diurne dans l'adipocyte potentialiseraient le développement d'un phénotype d'obésité via des altérations de la régulation métabolique sous contrôle des gènes d'horloge. Chez la souris, un régime HF entraîne plusieurs anomalies circadiennes. La période endogène de l'horloge suprachiasmatique est en effet, allongée et la prise alimentaire est augmentée en phase diurne (Kohsaka *et al.*, 2007). De plus, l'hétérodimère CLOCK-BMAL1 augmente l'expression de PPAR γ , qui lui-même active l'expression de BMAL1. Ce résultat démontre le lien entre la régulation du rythme circadien et le métabolisme lipidique (Froy, 2011).

Le TA, outre son rôle endocrine de sécrétion d'adipokines, exprime la majorité des gènes d'horloge, ce qui lui confère le rôle d'horloge secondaire (Ando *et al.*, 2005 ; Zvonic *et al.*, 2006). Les rythmes d'adipogenèse et de sécrétion de la leptine peuvent être considérés comme des conséquences physiologiques de l'horloge adipeuse. En effet, BMAL1 favorise l'adipogenèse et la lipogenèse (Shimba *et al.*, 2005). De plus, des cultures d'adipocytes en présence de mélatonine, simulant les phases veille/sommeil, présentent une augmentation de l'expression génique de CLOCK, PER1 et FAS (Alonso-Vale *et al.*, 2008). Ces adipocytes montrent également une augmentation de la lipogenèse et de la sécrétion de leptine, ainsi qu'une diminution de la lipolyse.

Le TA semble donc être un bon candidat dans l'étude du lien entre altérations métaboliques et perturbations du rythme circadien.

C. Les rats FR30 présentent-ils un décalage de leurs rythmes biologiques ?

Certains résultats semblent indiquer que nos animaux FR30 présenteraient des troubles de leurs rythmes biologiques. Nous avons en effet, observé que les rats FR30 présentent :

- un décalage de la prise alimentaire en phase diurne.
- une augmentation de la concentration de l'insuline observée le matin en conditions *ad libitum* qui pourrait refléter une phase postprandiale résultant du décalage de la prise alimentaire.
- une hypercorticostéronémie sans variation de la glycémie qui pourrait traduire un décalage de l'activation circadienne de l'axe corticotrope (Son *et al.*, 2011).
- une augmentation de l'expression de c-fos dans les neurones à POMC le matin. Or l'expression de c-fos dans ces neurones est activée par la prise alimentaire et l'augmentation de la concentration d'insuline (Singru *et al.*, 2007), et est normalement augmentée en phase sombre (Jamali and Tramu, 1997).

Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle la DM durant la gestation altérerait le rythme circadien de certains gènes d'horloge dans le TA, ce qui pourrait programmer la rythmicité de la régulation métabolique de la descendance. En effet, de récentes études suggèrent que la DM programmerait les horloges secondaires du rythme circadien (Ohta *et al.*, 2008). Chez le rat, la restriction protéique maternelle durant la gestation induit une altération des phases veille/sommeil chez la descendance (Datta *et al.*, 2000). L'hypoxie *in utero* altère également le rythme circadien et la réponse des horloges biologiques à la lumière chez l'adulte (Joseph *et al.*, 2002).

Pour tester notre hypothèse, nous avons réalisé une série d'expériences préliminaires sur l'expression de gènes d'horloge par RT-PCR semi-quantitative dans le TA. Nous avons également regardé leur expression dans le foie, organe clé de la régulation du métabolisme énergétique, qui est également une horloge périphérique secondaire.

Discussion : la DM induit-elle une perte du rythme circadien ?

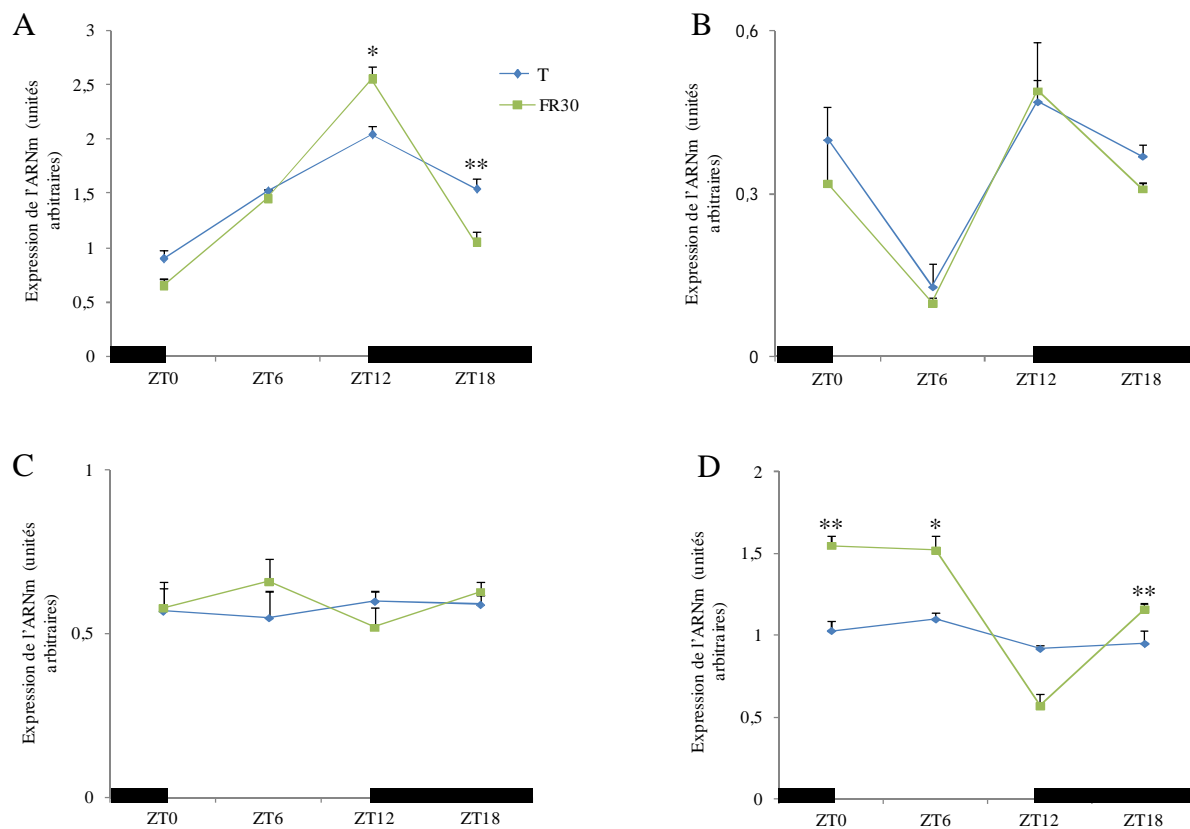


Figure 25 : Variation de l'expression de gènes d'horloge sur 24 heures dans le tissu adipeux périrénal. A : expression de PER1 ; B : expression de CRY1 ; C : expression de CRY2 ; D : expression de CLOCK ; ZT0 : début de la phase diurne ; Barre noire : phase nocturne ; Ligne bleue : rats Témoins ; Ligne verte : rats FR30. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$

1. Matériel et méthodes

○ Animaux

Les rats FR30 sont élevés en condition standard (cycle d'éclairement jour/nuit de 12 h/12 h avec phase diurne de 6 h à 18 h ; température $22\pm 2^{\circ}\text{C}$), et ont libre accès à l'eau et à la nourriture.

○ Collecte des échantillons

À 4 mois, les rats sont sacrifiés par décapitation à 0 h, 6 h, 12 h et 18 h, correspondant respectivement à ZT18, ZT0, ZT6 et ZT12. Le TA périrénal et le foie sont alors disséqués et congelés dans l'azote liquide (n=5 rats pour chaque horaire). L'ensemble de ces tissus est ensuite conservé à -80°C .

○ Expression génique

Nous avons utilisé la technique de RT-PCR quantitative précédemment décrite pour analyser l'expression des gènes PER1, CRY1, CRY2 et CLOCK dans le TA périrénal et le foie.

2. Résultats préliminaires

a. Le TA périrénal

Les premiers résultats montrent une altération de l'expression de PER1 et de CLOCK dans le TA des rats mâles FR30 adultes (Figure 25). En effet, le pic d'expression de PER1 est augmenté de manière significative à ZT12 et les oscillations de l'expression de CLOCK semblent accentuées chez les animaux FR30 adultes. Bien que les résultats ne soient pas significatifs, le rythme de l'expression de CRY2 montre une tendance à être inversé chez les animaux FR30. L'expression de CRY1 ne semble pas modulée dans notre modèle.

Discussion : la DM induit-elle une perte du rythme circadien ?

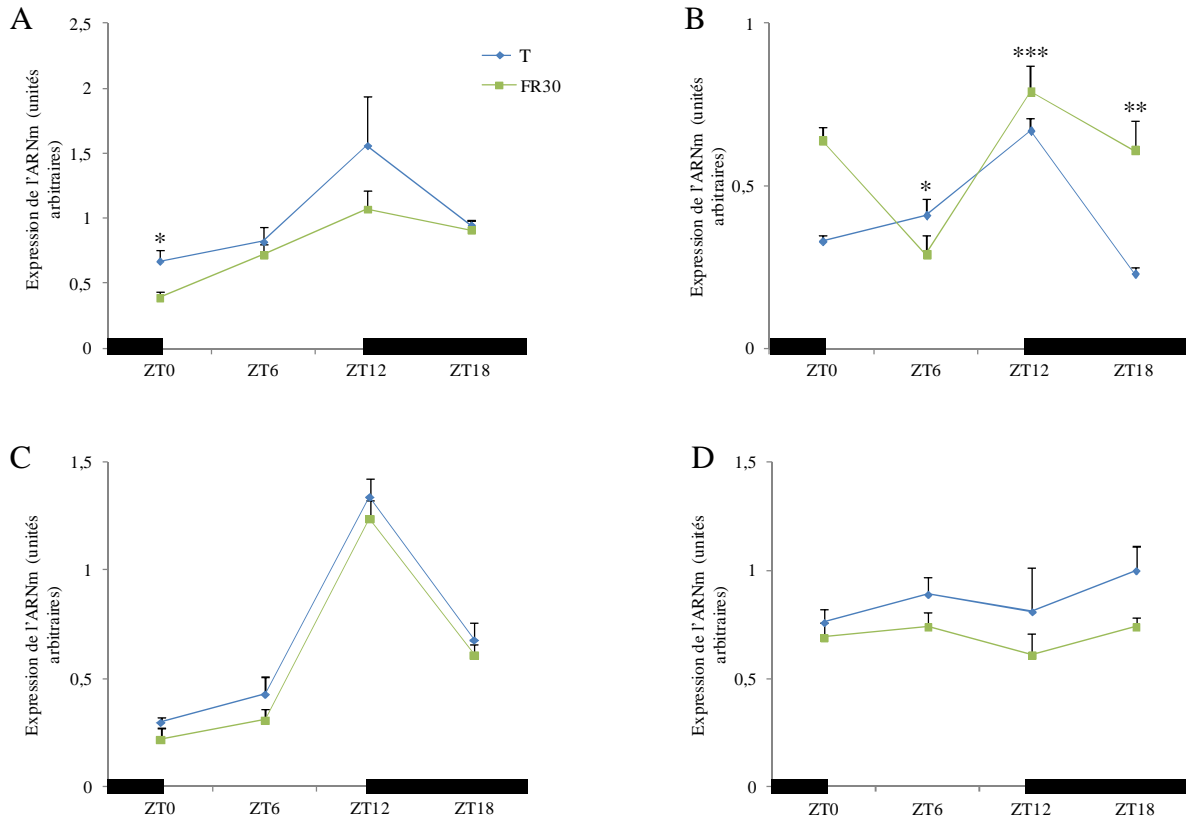


Figure 26 : Variation de l'expression de gènes d'horloge sur 24 heures dans le foie. A : expression de PER1 ; B : expression de CRY1 ; C : expression de CRY2 ; D : expression de CLOCK ; ZT0 : début de la phase diurne ; Barre noire : phase nocturne ; Ligne bleue : rats Témoins ; Ligne verte : rats FR30. $***P < 0,001$; $**P < 0,01$; $*P < 0,05$

b. Le foie

Contrairement au TA, l'expression de PER1 est diminuée dans le foie des animaux FR30 (Figure 26). L'expression de CRY1 quant à elle, est dans l'ensemble augmentée. Nous n'avons pas observé de variation de l'expression de CRY2 ni de CLOCK.

3. Interprétation

Il semblerait donc que l'expression de certains gènes d'horloge soit modulée de façon différente de celle des rats T, dans le TA périrénal et le foie des rats mâles adultes FR30. Ces altérations pourraient être à l'origine de perturbations du rythme de la régulation métabolique périphérique. L'hyperleptinémie et l'hyperinsulinémie observées dans notre modèle FR30 pourraient donc ne pas être chroniques, mais ponctuelles. Nous observerions en effet, un décalage du pic de sécrétion de ces hormones, ce qui pourrait, en partie, expliquer l'absence de répercussion sur le poids, la prise alimentaire et la glycémie des rats FR30.

Cependant, nos résultats ne permettent pas de conclure quant à un réel décalage du rythme circadien chez les rats FR30. Il est en effet, difficile d'estimer si les rats FR30 présentent une réelle perturbation du niveau ou du rythme d'expression des gènes d'horloge. Des dosages hormonaux de la leptine, de l'insuline et des glucocorticoïdes pourraient permettre de clarifier ce point. Il serait également intéressant de mettre en place plus d'horaires de sacrifices sur 24 heures, pour obtenir des cinétiques d'expression ou de sécrétion plus précises. Enfin, des expériences d'*Hybridation In Situ* (HIS) menées sur le SNC, renseigneraient quant à un éventuel décalage de l'expression des gènes d'horloge au niveau central. Il serait également intéressant de placer nos animaux en cages métaboliques afin d'évaluer leur activité locomotrice, leur dépense énergétique ainsi que leur prise alimentaire, en fonction des phases veille/sommeil.

Il est également possible que les modulations géniques soient plus subtiles dans notre modèle. En effet, bien que le rôle des gènes d'horloge dans le développement du SM ne soit pas encore entièrement connu, ils semblent exercer une modulation épigénétique sur plusieurs systèmes métaboliques, en réponse à une altération de l'apport nutritionnel. La protéine CLOCK possède en effet, une activité *Histone AcetylTransferase* (HAT) qui diminue la

Discussion : la DM induit-elle une perte du rythme circadien ?

fonction de l'horloge circadienne (Doi *et al.*, 2006). Le rythme, la qualité et la quantité de l'apport nutritionnel durant la gestation pourraient donc entraîner des modulations épigénétiques de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique, résultant en une altération de l'expression des gènes d'horloge et augmentant le risque de développer un SM. En effet, l'exposition à un régime HF tout au long de la gestation, augmente l'acétylation de certains histones dans le foie (Suter *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces données pourraient ouvrir de nouvelles perspectives sur les mécanismes de la programmation fœtale dans notre modèle.

Conclusion générale

Nos travaux montrent que le modèle FR30 ne présente que de subtiles altérations de la régulation du métabolisme énergétique à l'âge adulte. En effet, nous n'avons observé que peu de variations visibles de l'architecture et de l'expression génique de l'hypothalamus, ce qui reflète une possible protection du système nerveux central suite à une dénutrition maternelle, en accord avec l'hypothèse de « *brain sparing effect* ». *A contrario*, la dénutrition maternelle programme à long terme et de manière dépôt-spécifique, le profil d'expression génique de deux dépôts différents de tissu adipeux chez la descendance FR30 adulte. De plus, la dénutrition maternelle n'exacerbe pas de façon marquée les perturbations métaboliques induites par le régime *high-fat*.

En comparaison avec d'autres modèles de programmation foetale, les légères altérations des mécanismes de régulation de la balance énergétique au niveau de l'axe hypothalamo-adipocytaire, observées chez le rat mâle FR30 adulte à 4 mois, s'expliqueraient, au moins en partie, par la cinétique de croissance postnatale. En effet, l'absence de « *catch-up* » suite à la dénutrition maternelle, semble protéger de l'apparition rapide de pathologies métaboliques.

Par opposition au modèle FR30 de Vickers, notre modèle FR30 pourrait être un modèle de « programmation adaptative », qui empêcherait, ou au moins retarderait, l'apparition de pathologies associées au syndrome métabolique. Le suivi métabolique des animaux jusqu'à 8 à 12 mois d'âge permettrait de répondre à cette hypothèse. Ces résultats ouvrent de nouveaux axes de recherche sur les mécanismes de la programmation foetale dans ce modèle. En effet, l'étude de mécanismes de protection, plutôt que d'apparition, de pathologies métaboliques, pourrait constituer une voie thérapeutique prometteuse.

Travaux annexes

**Influence of prenatal undernutrition on the effects of clozapine
and aripiprazole in the adult male rats: Relevance to a
neurodevelopmental origin of schizophrenia?**

Guillemot* J., Lukaszewski* M.A., Montel V., Delahaye F., Mayeur S., Laborie
C., Dickes-Coopman A., Dutriez-Casteloot I., Lesage J., Breton C., Vieau D

* : co-auteurs

European Journal of Pharmacology



Endocrine Pharmacology

Influence of prenatal undernutrition on the effects of clozapine and aripiprazole in the adult male rats: Relevance to a neurodevelopmental origin of schizophrenia? ☆, ☆ ☆

Johann Guillemot¹, Marie-Amélie Lukaszewski¹, Valérie Montel, Fabien Delahaye, Sylvain Mayeur, Christine Laborie, Anne Dickes-Coopman, Isabelle Dutriez-Casteloot, Jean Lesage, Christophe Breton, Didier Vieau^{*}

Equipe Dénutritions Maternelles Périnatales (Unité Environnement Périnatal et Croissance, EA4489), Bâtiment SN4, 2^{ème} étage, Université des Sciences et Technologies de Lille, Université Lille-Nord de France, 59 655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2010

Received in revised form 16 March 2011

Accepted 6 April 2011

Available online 15 April 2011

Keywords:

Maternal undernutrition

Metabolic syndrome

Atypical neuroleptics

Schizophrenia

Hypothalamus

ABSTRACT

Epidemiological and experimental data indicate that maternal undernutrition may sensitize the offspring to the apparition of chronic diseases such as metabolic syndrome and schizophrenia, suggesting that these pathologies may have a developmental origin. To test this hypothesis, we have compared the effects of a 4 weeks treatment of clozapine (30 mg/kg once daily, p.o.) or aripiprazole (10 mg/kg once daily, p.o.) on metabolic and hormonal parameters in 4-month-old male animals from control or 70% prenatally food-restricted mothers (FR30 model). Both neuroleptics did not markedly modify body weight gain and food intake in both controls and FR30 rats. Clozapine decreased insulin secretion in both groups but significantly diminished leptin, corticosterone and glucose plasma levels only in FR30 animals. Aripiprazole decreased corticosterone plasma levels only in FR30 animals. Using quantitative RT-PCR array containing 84 obesity-related genes, we identified several genes involved in energy metabolism regulation whose expression was modified by clozapine or aripiprazole in adult male rat hypothalami. In addition, we demonstrated that expression of some of these genes was differentially affected by each neuroleptic in the hypothalamus of both FR30 and control animals. Although no marked metabolic alterations were observed in both control and FR30 animals after clozapine or aripiprazole treatment, our data indicate that offspring from undernourished mothers exhibit a modified sensitivity to atypical neuroleptics. Our results do not rule out a putative developmental origin of schizophrenia and may help to understand the way by which atypical neuroleptics, such as clozapine, sensitize schizophrenic patients to the development of metabolic disorders.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Second-generation antipsychotic medication is a great benefit to patients with schizophrenia. However, one constellation of adverse effects is an increased risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. Among these neuroleptics, olanzapine and clozapine are more strongly associated with metabolic risks than aripiprazole and risperidone (Brooks et al., 2009; Newcomer, 2007). To unravel the role of atypical neuroleptics on metabolism, several animal models have been developed but the data obtained led to conflicting results. Clozapine and olanzapine's effects in humans appear to be most validly modeled in

female rodents in which numerous studies have demonstrated that both neuroleptics increased food intake, body weight and intra-abdominal fat (Albaugh et al., 2006; Arjona et al., 2004; Fell et al., 2004; Pouzet et al., 2003). It was recently reported that a 6-week treatment with olanzapine resulted in a significant increase of food intake associated with hypothalamic cellular proliferation as well as augmentation of body weight and size and numbers of adipocytes in mice (Yamauchi et al., 2010). In male rats, long term intraperitoneal clozapine injections at low concentrations had no effect (Albaugh et al., 2006; Pouzet et al., 2003) whereas high concentrations decreased food intake and body weight (Baptista et al., 1993). However, there are also few studies that failed to report any effect of atypical neuroleptics on metabolic parameters (Baptista et al., 2004; Lee and Clifton, 2002), suggesting that the rat is an inadequate model to study the effects of atypical neuroleptics on weight gain (Choi et al., 2007).

Several studies suggested that schizophrenic patients may present, in comparison to the general population, a higher susceptibility to develop metabolic alterations, even in the absence of treatment (Allison

☆ Funding: This work was supported by Région Nord-Pas de Calais, France et le Fonds de Développement Européen Régional.

☆☆ Disclosure statement: The authors have nothing to declare.

* Corresponding author. Tel.: +33 320 43 43 68; fax: +33 320 33 63 49.

E-mail address: didier.vieau@univ-lille1.fr (D. Vieau).

¹ Equal contribution.

et al., 1999; Ryan et al., 2003; Thakore et al., 2002). It has been proposed that maternal undernutrition leading to intrauterine growth retardation (IUGR) might play a role in the increased propensity to develop schizophrenia (Brown and Susser, 2008; Casper, 2004; Susser et al., 2008; Wahlbeck et al., 2001; Xu et al., 2009), leading to the notion that schizophrenia may have a neurodevelopmental origin. The existence of a close association between IUGR and metabolic diseases such as obesity, hypertension and type II diabetes has been established several years ago from epidemiological studies (Barker, 2007). Together these data suggest that maternal undernutrition might be a causal link between the parallel development of schizophrenia and metabolic alterations observed in several patients.

We have developed an animal model of IUGR using a prenatal maternal 70% food-restricted diet (FR30). FR30 adult male rats exhibit metabolic perturbations such as hypertension (Riviere et al., 2005), glucose intolerance and altered feeding behavior (Breton et al., 2009). In view of these data, we speculated that the use of weight-gain inducing neuroleptics such as clozapine would amplify the metabolic abnormalities observed in FR30 animals. Thus, this study aimed at comparing the effects of chronic ingestion of clozapine and aripiprazole in both control and FR30 rats on several metabolic and hormonal parameters, as well as on the hypothalamic expression of several obesity-related genes.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 1986 (86/609/EEC). Animal use accreditation by the French Ministry of Agriculture (No. 04860) has been granted to our laboratory for experimentation with rats.

Adult Wistar rats (265–330 g) were purchased from Charles Rivers Laboratories (L'Arbresle, France) and housed (6 per cage). Animal rooms were maintained on a 12-/12-hour dark/light schedule and animals were permitted free access to food (regular rat chow No. 113, total digestible energy 2900 kcal/kg; UAR, Villemoisson sur-orge, France) and tap water.

Two groups of pregnant rats were studied. In the control group (control), pregnant dams were fed *ad libitum*, while pregnant dams from the food-restricted group fed 30% of the daily intake (FR30) of control pregnant dams, from day 1 of pregnancy until delivery. At parturition, pups were counted and litter size was adjusted to 8 pups per dam in both control and FR30 mothers. After weaning, all animals were caged individually and fed *ad libitum*. Body weight and food intake of adult male offspring from the control (n = 30) or FR30 (n = 30) group were studied at 4 months of age.

2.2. Drugs and experimental procedure

Clozapine (Novartis, Switzerland) and aripiprazole (Bristol-Myers Squibb, France) were dissolved in water and in water containing 0.5% carboxymethylcellulose, respectively. Both solutions were prepared each day and vehicle (water) and drug treatments were administered by oral gavage using a 2 ml dose volume. Control and FR30 rats were randomly divided into three groups (n = 10). Both FR30 and control 4 months-old rats were administered chronically with vehicle, clozapine (30 mg/kg) or aripiprazole (10 mg/kg) daily for 30 consecutive days. Neuroleptics were administered at a concentration similar to those used in other studies (Inoue et al., 1998; Jordan et al., 2004) in 4-month-old male rats which have been shown to exhibit several metabolic alterations when born from undernourished mothers (Breton et al., 2009; Riviere et al., 2005). The rats were weighed once a week to adjust the amount of drugs administered to their actual body weight. Food consumption was also recorded weekly during the treatment.

2.3. Plasma and tissue collections

Before sacrifice, animals were fasted for 16 h. The blood glucose level of 16-h-fasted animals was determined using an automatic glucometer (glucotrend 2, Roche Diagnostics, France) and animals were rapidly weighed and killed by decapitation. Trunk blood samples were collected in tubes pre-rinsed with 5% EDTA and centrifuged at 4000 g for 10 min at 4 °C. Aliquots of the supernatants were stored at –20 °C until assayed. Hypothalami, perirenal white adipose tissue and interscapular brown adipose tissue were rapidly removed, weighed and frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until used.

2.4. Metabolic and endocrine parameters

Plasma parameter levels following 16 hours fasting were investigated with commercially available kits. Assay kits were applied to determine the contents of plasma triglycerides (61238 Triglyceride Enzymatique PAP100, BioMérieux, France) as well as free fatty acid (FFA) (reference 999–75406, Wako Chemicals, Neuss, Germany). Plasma insulin concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (DRG, International, Inc. USA). Plasma leptin concentrations were determined by enzyme immunoassay (SPIBIO, Montigny le Bretonneux, France). Plasma corticosterone levels were quantified by a competitive enzyme immunoassay (Immunodiagnostic Systems Ltd, Boldon, U.K.). Each point has been measured in duplicate. The assay sensitivity was 0.01 ng/ml (insulin), 0.05 ng/ml (leptin) and 0.55 ng/ml (corticosterone). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.8–4.6% and 1.9–4.5% (insulin), 3.9–4.8% and 6.0–6.4% (leptin), 3.8–6.6% and 7.5–8.6% (corticosterone), respectively.

2.5. Hypothalamic obesity-related gene expression

Hypothalamic gene expression was determined in male rat using RT-qPCR as described and validated previously (Aslanidi et al., 2007). RT-qPCR assays were performed using the Rat Obesity RT² Profiler PCR Array (SuperArray Bioscience, Frederick, MD, USA, <http://www.superarray.com>) on a Roche Lightcycler 480. Data analysis is available at the company website (<http://www.superarray.com/pcr/arrayanalysis.php>). Briefly, RNA was extracted and purified from hypothalami of both control and FR30 animals using the TRIzol reagent (Gibco BRL, Strasbourg, France). The quality of total RNA was assessed by determining the 260/280 absorbance ratio and by agarose gel electrophoresis. Equal amount of total RNA (in µg) isolated from a particular tissue was pooled for each treatment group (n = 3 animals per group). First-strand cDNAs were generated using RT² First Strand Kit (Cat. No. C-03, SuperArray). For real-time PCR, first-strand cDNAs were added to the RT qPCR Master Mix (SuperArray Bioscience). Samples were heated for 10 min at 95 °C and then subjected to 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing and elongation at 60 °C for 1 min. Relative expression values were determined by the following rule: for each sample, we calculated difference between the CT (Δ CT) values for the gene of interest and housekeeping gene (Ldha, Actb and Rpl13a). Finally, fold change of interrogated gene expression in each tissue was calculated as fold change = $2^{-\Delta\Delta CT}$. The results are expressed as scatter plots and only genes whose mRNA levels changed more than 2 fold in either direction (up- and down- regulation) were selected.

To confirm the results obtained using the Rat Obesity RT² profiler PCR array on pooled samples, we analyzed, using RT-qPCR, the hypothalamic gene expression of cholecystokinin (CCK) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in FR30 and control male rat animals treated or not with each neuroleptic (n = 4 animals per group). These samples were different from those that have been used for PCR arrays. Relative expression levels of RNA per sample were quantified by SYBR Green 1 assay on Roche Light Cycler 480 sequence detection assay

Table 1
Primer sequences of the genes studied by qRT-PCR.

Gene	Refseq number	Forward	Reverse
BDNF	NM_012513	5'-GATGAGGACCAGAAGGTTTCG-3'	5'-TCCAGCAGAAAGAGCAGAGG-3'
CCK	NM_012829	5'-CAGCAGCCGTTGGAACC-3'	5'-GACACACGCCGCACTTCA-3'
LDHA	NM_017025	5'-ATCCCATTTCCACCATGATTAA-3'	5'-GTCAGGAGTCAGTGCACCTTC-3'

(Meylan, France). For each transcript, PCR was performed in duplicates with 10 μ l final reaction volumes with 1 μ l cDNA, 8 μ l of mix, and 0.5 μ l of each primer set (Table 1). PCR was conducted using the following cycle parameters: 10 min at 95 °C, and 40 three-steps cycles of 15 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C. The assay was performed following the manufacturer's recommendations. A pool of cDNA from control tissues was used as a standard (in threefold serial dilutions) for quantitative correction. All cDNA samples were applied in dilution of 1:5 to obtain results within the range of the standard. Analysis of transcript level was carried out using first determination of the threshold cycle CT for each reaction corrected by the efficiency. Then the Δ CT was calculated by subtracting the mean CT of the calibrator from each value of CT for each gene. The amount of target relative to a calibrator was computed by $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.6. Statistical analysis

All data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA and post-hoc comparison by Dunnett's test. Probability values less than 0.05 were considered significant. Data were analyzed with the Prism program (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1. Body weight, tissue weight and food intake

As described in Table 2, FR30 rats-treated vehicle, clozapine or aripiprazole displayed no significant differences of body weight gain compared to corresponding control rats. Moreover, no effects on body weight gain were observed after chronic administration of either clozapine or aripiprazole in control rats. In contrast, in FR30 rats, only clozapine treatment induced a significant decrease of body weight gain ($P < 0.05$).

FR30 rats-treated vehicle, clozapine or aripiprazole had larger fat deposits in interscapular brown adipose tissue than corresponding control rats-treated (Table 2, $P < 0.01$; $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively) whereas no difference was observed in perirenal white adipose tissue between control and FR30 animals-treated vehicle or clozapine (Table 2). Treatment of control or FR30 animals with clozapine showed

no significant difference in the relative mass of perirenal white adipose tissue and interscapular brown adipose tissue when compared to rats treated with vehicle (Table 2). In contrast, aripiprazole treatment caused a significant decrease in the relative mass of interscapular brown adipose tissue in control and FR30 rats compared to animals-treated vehicle (Table 2, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively).

As described in Table 2, 30 days after vehicle chronic treatment, the food consumption was similar in FR30 rats compared to the corresponding control animals. In control rats, clozapine and aripiprazole treatment induced no significant changes in food intake. In contrast, in FR30 animals, aripiprazole, but not clozapine, treatment decreased food intake compared with vehicle-treated animals (Table 2, $P < 0.01$).

3.2. Plasma levels of hormones and metabolic parameters

FR30 rats-treated vehicle had higher leptin and insulin concentrations by comparison with control animals-treated vehicle (Table 2, $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). In contrast, corticosterone levels were lower in FR30 than in control animals (Table 2, $P < 0.05$).

In control rats, we observed a significant effect of neuroleptic treatment only with clozapine which decreased significantly insulin and triglycerides concentrations (Table 2, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

In FR30 rats, clozapine treatment induced a significant decrease of leptin, insulin, corticosterone, triglycerides and glucose concentrations compared with vehicle treated-rats (Table 2, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$ and $P < 0.01$, respectively). In contrast, aripiprazole treatment induced a significant decrease only of corticosterone levels compared with vehicle treated-rats (Table 2, $P < 0.01$). Finally, both neuroleptic treatments induced no modification of free fatty acid plasma levels in control and FR30 rats (Table 2).

3.3. Hypothalamic gene expression

Although some genes exhibited modified expression in vehicle treated-FR30 versus control adult rat hypothalamus (Fig. 1), neuroleptic treatment also led to gene expression profile variation between both groups and some of these genes were differentially affected by each neuroleptic in both FR30 and control animals (Fig. 2). Following chronic clozapine and aripiprazole treatments, we observed opposite patterns of gene expression between both groups. FR30 rats exhibited

Table 2
Effects of clozapine and aripiprazole treatment on morphometric and biological parameters of control and FR30 rats.

	Control			FR30		
	Vehicle	Clozapine	Aripiprazole	Vehicle	Clozapine	Aripiprazole
Weight gain (%) [*]	112 \pm 3	104 \pm 3	106 \pm 4	113 \pm 3	105 \pm 1 ⁽⁺⁾	108 \pm 3
Interscapular brown adipose tissue (g/kg)	0.76 \pm 0.07	0.68 \pm 0.05	0.51 \pm 0.04 ⁽⁺⁺⁺⁾	1.04 \pm 0.07 ^b	1.05 \pm 0.04 ^c	0.71 \pm 0.05 ^{b(+++)}
Perirenal white adipose tissue (g/kg)	11.71 \pm 0.96	9.02 \pm 0.92	9.74 \pm 0.66	11.31 \pm 0.75	8.89 \pm 0.89	12.65 \pm 0.5 ^b
Food intake (kcal/kg/day) [*]	136 \pm 2	130 \pm 2	128 \pm 2	135 \pm 2	136 \pm 2	126 \pm 2 ⁽⁺⁾
Leptin (ng/ml)	4.33 \pm 0.83	2.05 \pm 0.69	2.93 \pm 0.58	9.85 \pm 1.11 ^b	4.52 \pm 0.89 ⁽⁺⁺⁺⁾	8.77 \pm 1.35 ^b
Insulin (ng/ml)	0.96 \pm 0.1	0.48 \pm 0.08 ⁽⁺⁾	0.85 \pm 0.1	1.31 \pm 0.12 ^a	0.64 \pm 0.12 ⁽⁺⁺⁺⁾	1.07 \pm 0.05
Corticosterone (μ g/dl)	17.44 \pm 3.19	18.35 \pm 5.78	13.92 \pm 3.84	8.58 \pm 0.97 ^a	3.72 \pm 0.63 ^{a(+++)}	3.58 \pm 0.72 ^{a(+++)}
Triglycerides (mg/dl)	197.25 \pm 21.41	128.10 \pm 8.65 ⁽⁺⁾	207.11 \pm 20.50	254.33 \pm 33.05	138.33 \pm 6.80 ⁽⁺⁺⁺⁾	201.22 \pm 21.09
Glucose (mg/dl)	87 \pm 1.36	86.5 \pm 2.73	82.6 \pm 2.3	90.7 \pm 1.81	80.7 \pm 2.16 ⁽⁺⁺⁺⁾	89.9 \pm 1.64 ^a
Free fatty acid (mmol/l)	0.48 \pm 0.05	0.47 \pm 0.05	0.54 \pm 0.07	0.50 \pm 0.06	0.45 \pm 0.03	0.51 \pm 0.03

Values are means \pm S.E.M. (n = 10 rats/group). ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$, FR30 versus control in the same condition (vehicle, clozapine or aripiprazole); ⁽⁺⁾ $P < 0.05$, ⁽⁺⁺⁾ $P < 0.01$, ⁽⁺⁺⁺⁾ $P < 0.001$, clozapine or aripiprazole versus vehicle in the same group of rats (control or FR30).

* Results are expressed as values in rats after 30 days treatment versus values in animals before any treatment.

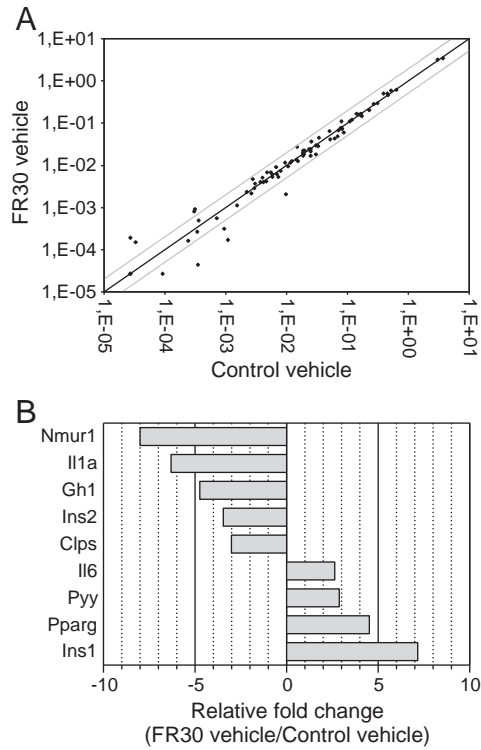


Fig. 1. Comparison of hypothalamic gene expression in control and FR30 adult male rats. (A), scatter plot analysis of 84 obesity-related genes in control versus FR30 rats treated with vehicle. Data are expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$, where ΔCT represents difference between the threshold values for the gene of interest and housekeeping genes. For each graph, gray lines indicate twofold expression differences. (B), genes differentially expressed in control versus FR30 rats treated with vehicle. Data are expressed as FR30/control ratio of $2^{-\Delta CT}$ and cut off is <-2 (down regulated genes) and >2 (overexpressed genes).

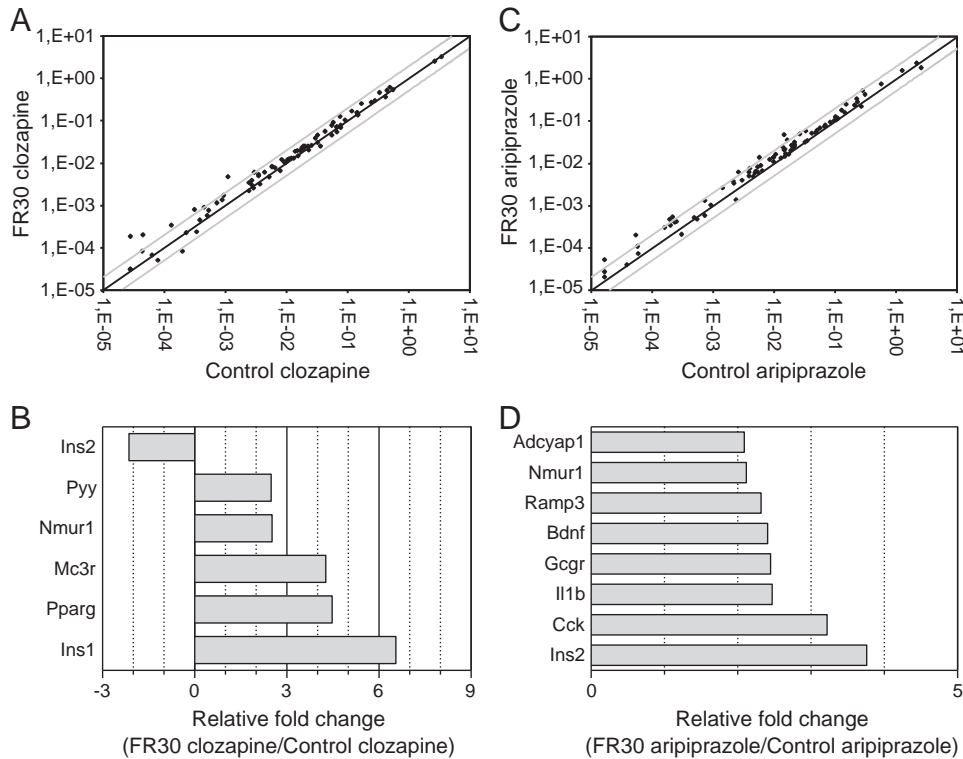


Fig. 2. Comparison of hypothalamic gene expression in control and FR30 adult male rats treated with clozapine or aripiprazole. (A, C), scatter plot analysis of 84 obesity-related genes in control versus FR30 rats treated with clozapine (A) or aripiprazole (C). Data are expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$, where ΔCT represents difference between the threshold values for the gene of interest and housekeeping genes. For each graph, gray lines indicate twofold expression differences. (B, D), genes differentially expressed in control versus FR30 rats treated with clozapine (B) or aripiprazole (D). Data are expressed as FR30/control ratio of $2^{-\Delta CT}$ and cut off is <-2 (down regulated genes) and >2 (overexpressed genes).

a trend toward gene expression up-regulation (Fig. 3A,B,C and D) whereas control rats showed a tendency for gene expression down-regulation (Fig. 4A,B,C and D). The genes differentially expressed in hypothalamus of control and FR30 rats treated with vehicle, clozapine or aripiprazole are summarized in Table 3.

To validate the PCR array data, we determined the BDNF and CCK mRNA variation levels on individual samples. We observed that chronic clozapine and aripiprazole treatments increased mRNAs for BDNF (+1.71, +1.78 fold, respectively) and CCK (+2.06, +3.04 fold, respectively) in adult FR30 offspring (Fig. 5A,B), whereas control rats exhibited an increase of CCK mRNA levels (+2.1 fold) only after clozapine treatment (Fig. 5B). The real time quantitative RT PCR expression levels correlated with the results of PCR array for both BDNF and CCK (spearman correlation coefficient $r = 0.9686$, $P < 0.01$ for BDNF; $r = 0.8671$, $P < 0.05$ for CCK) confirming the PCR array data (Fig. 5C,D).

4. Discussion

Clinical and experimental evidence supports the concept that olanzapine and clozapine are qualitatively more problematic than other drugs like aripiprazole in both the severity of their associated weight gain and greater risk of diabetes (Brooks et al., 2009; Newcomer, 2007). Our study partly confirms these observations showing that chronic clozapine treatment induces a more pronounced effect on biological parameters in rats than aripiprazole. However, our findings do not match with human clinical data in terms of weight gain as well as development of insulin resistance.

In rat, a number of studies have been performed to investigate the mechanisms involved in the metabolic adverse effects associated with several antipsychotic drugs. The results obtained have been conflicting, partly because the phenotype observed for rats does often not mimic the

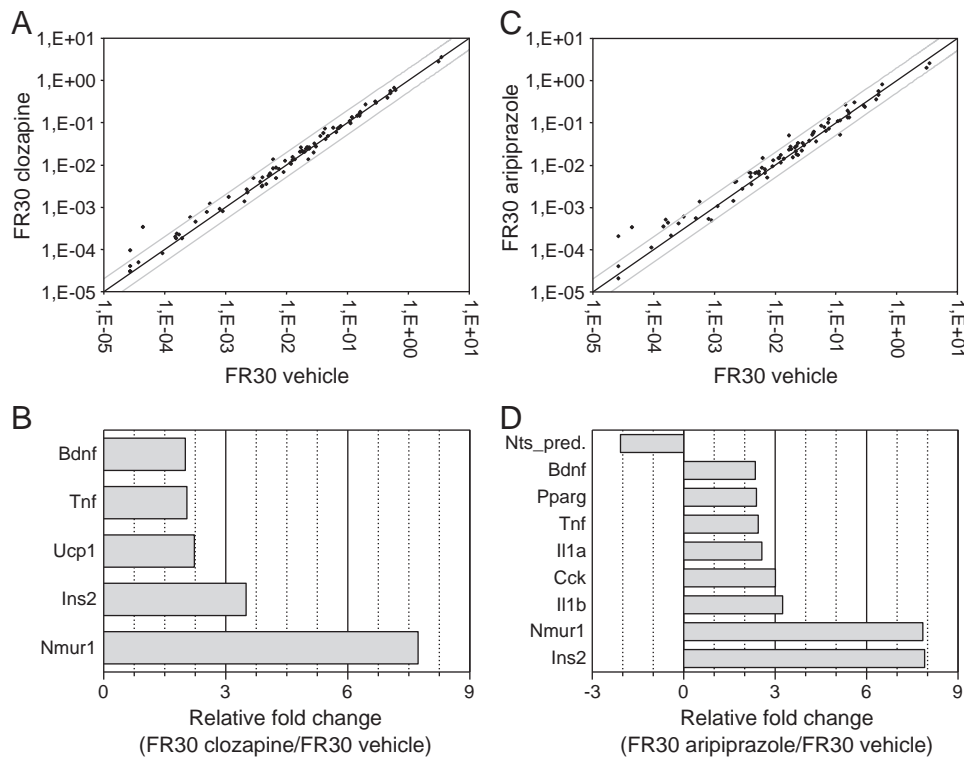


Fig. 3. Effect of clozapine and aripiprazole on hypothalamic gene expression in FR30 adult male rats. (A, C), scatter plot analysis of 84 obesity-related genes in FR30 treated with vehicle *versus* FR30 rats treated with clozapine (A) or aripiprazole (C). Data are expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$, where ΔCT represents difference between the threshold values for the gene of interest and housekeeping genes. For each graph, gray lines indicate twofold expression differences. (B, D), genes differentially expressed in FR30 rats treated with vehicle *versus* FR30 rats treated with clozapine (B) or aripiprazole (D). Data are expressed as clozapine (or aripiprazole)/vehicle ratio of $2^{-\Delta CT}$ and cut off is < -2 (down regulated genes) and > 2 (overexpressed genes).

human clinical situation (Albaugh et al., 2006; Baptista et al., 1993, 2004; Choi et al., 2007; Lee and Clifton, 2002; Pouzet et al., 2003). Female rats seem more prone to develop antipsychotic-induced weight gain than male reflecting clear-cut sex-related differences, which is not the case in humans (Albaugh et al., 2006; Arjona et al., 2004; Fell et al., 2004; Pouzet et al., 2003). In addition, several of the drugs that apparently induce weight gain in rats are not associated with weight gain in humans (Pouzet et al., 2003). Traditionally, antipsychotic drugs have been administered to rats via intraperitoneal injections (Fell et al., 2004; Goudie et al., 2002; Lee and Clifton, 2002; Thornton-Jones et al., 2002), subcutaneous injections (Baptista et al., 1993, 2004) or orally (Arjona et al., 2004; Pouzet et al., 2003). When the drugs were mixed in the food that was available *ad libitum*, instead of being administered orally, the weight of fat tissue in male rats increased (Minet-Ringuet et al., 2007). In addition, the differing outcome of rat neuroleptic treatment procedures may reflect sensitivity differences such as the genetic background of the species as well as the dose used during the study (Cooper et al., 2008). The complexity of designing suitable experimental animal models is emphasized in the present study that did not seem to align in a direct way with translational predictions from clinical findings in schizophrenia. However, the use of a unique concentration of neuroleptic in young adult male rat (4-month-old) might explain this apparent lack of translational correspondence regarding some metabolic parameters.

Over the last decades, several studies have shed new lights into the underlying mechanisms of atypical neuroleptic actions on metabolic side effects. In particular, it has been suggested that antipsychotics drugs can directly modify glucose and lipid metabolism in the periphery independently of any central effect (Reynolds and Kirk, 2010). We have shown that clozapine diminished plasma insulin levels without hyperglycemia. Consistent with our findings, it has been reported that this neuroleptic has a direct effect to impair insulin release via different mechanisms independent of adiposity, *i.e.* antagonism of pancreatic islet

cells muscarinic M3 receptor (Johnson et al., 2005) and direct ATP-sensitive K^+ ion channels blockade (Best et al., 2005). Recent data suggested that clozapine effects on plasma glucose and insulin levels may be also driven by sympathetic autonomic nervous system, at least in part, via adrenergic receptor antagonism (Murashita et al., 2007; Savoy et al., 2010).

We also showed that chronic neuroleptic treatments led to significant decreased triglycerides plasma levels. It has been recently demonstrated that many antipsychotic drugs including clozapine activate lipogenesis and increase rates of fatty acid synthesis in the rat liver (Ferno et al., 2009) as well as in hepatocytes cell cultures (Laouressergues et al., 2010). Thus, we hypothesized that neuroleptic treatments may alter lipid metabolism that might result in an accumulation of triglycerides in liver, lower plasma triglycerides levels leading to fat pads decrement and hypoleptinemia. In humans, atypical antipsychotics may be toxic for the liver and some cases of cholestasis have been reported (Hung et al., 2009). However, further studies are needed to investigate whether liver steatosis occurred in our rat model. As suggested by others (Baptista et al., 2004; Minet-Ringuet et al., 2007; Yang et al., 2007), we cannot rule out that clozapine treatment directly acts via adrenergic system to modulate lipid metabolism and/or gene expression in rat adipose tissue.

Overall our data demonstrate that adult offspring FR30 rats display modified sensitivity to antipsychotic drugs. Interestingly, chronic clozapine and aripiprazole treatments decreased plasma corticosterone levels in FR30 rats whereas no effect was observed in control animals. Thus, we hypothesize that the differential effect of chronic neuroleptic treatments on HPA axis regulation in both groups might, at least in part, accounts for such a different antipsychotic sensitivity on metabolic parameters. On the one hand, atypical antipsychotics significantly reduce cortisol secretion in patients with schizophrenia as well as in healthy controls (Walker et al., 2008) whereas conflicting results are reported regarding the HPA axis regulation in rodents (Basta-Kaim et al.,

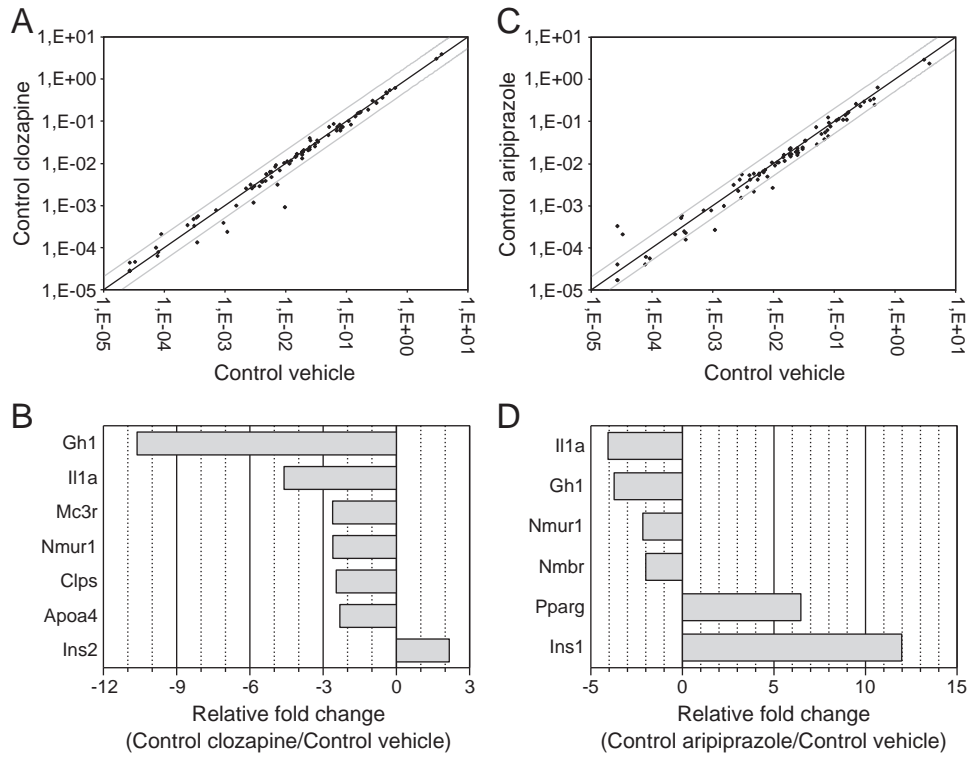


Fig. 4. Effect of clozapine and aripiprazole on hypothalamic gene expression in control adult male rats. (A, C), scatter plot analysis of 84 obesity-related genes in control treated with vehicle versus control rats treated with clozapine (A) or aripiprazole (C). Data are expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$, where ΔCT represents difference between the threshold values for the gene of interest and housekeeping genes. For each graph, gray lines indicate twofold expression differences. (B, D), genes differentially expressed in control rats treated with vehicle versus control rats treated with clozapine (B) or aripiprazole (D). Data are expressed as clozapine (or aripiprazole)/vehicle ratio of $2^{-\Delta CT}$ and cut off is <-2 (down regulated genes) and >2 (overexpressed genes).

2011; Tulipano et al., 2007). On the other hand, we demonstrated previously that maternal undernutrition programs the offspring HPA axis throughout the lifespan leading to male rats unable to cope with severe stress (Lesage et al., 2006; Sebaai et al., 2004). In particular, we showed that 4-month-old adult FR30 male rats displayed hypercorti-

costerolemia under resting conditions (Breton et al., 2009) while they did not increase their corticosterone plasma levels in response to a 48 hours fasting. We show here that FR30 animals, when compared to controls, displayed reduced corticosterone plasma levels after an overnight fast suggesting that this procedure might induce a mild

Table 3
List of genes differentially expressed in hypothalamus of control and FR30 rats treated with vehicle, clozapine or aripiprazole.

Symbol	Gene name	Refseq number	FR30/Control			FR30		Control	
			Vehicle	Clozapine	Aripiprazole	Clozapine/ Vehicle	Aripiprazole/ Vehicle	Clozapine/ Vehicle	Aripiprazole/ Vehicle
Adcyap1	Adenylate cyclase activating polypeptide 1	NM_016989	1.42	1.39	2.09	1.35	1.02	1.38	-1.43
Apoa4	Apolipoprotein A-IV	NM_012737	-1.35	2.00	1.01	1.17	1.30	-2.31	-1.05
Bdnf	Brain derived neurotrophic factor	NM_012513	-1.10	1.41	2.41	2.01	2.35	1.29	-1.13
Cck	Cholecystokinin	NM_012829	-1.47	-1.52	3.22	1.53	3.01	1.58	-1.58
Clps	Colipase, pancreatic	NM_013139	-3.01	1.18	-1.33	1.44	1.87	-2.46	-1.22
Gcgr	Glucagon receptor	NM_172092	1.38	1.43	2.45	1.59	1.14	1.53	-1.56
Gh1	Growth hormone 1	NM_001034848	-4.73	1.54	-1.85	-1.46	-1.45	-10.62	-3.72
Il1a	Interleukin 1 alpha	NM_017019	-6.30	-1.05	1.66	1.31	2.57	-4.60	-4.06
Il1b	Interleukin 1 beta	NM_031512	-1.52	-1.49	2.47	1.46	3.25	1.43	-1.15
Il6	Interleukin 6	NM_012589	2.64	1.98	1.05	1.15	-1.48	1.53	1.69
Ins1	Insulin 1	NM_019129	7.17	6.55	-1.47	-1.05	1.14	1.04	11.98
Ins2	Insulin 2	NM_019130	-3.45	-2.14	3.76	3.50	7.91	2.17	-1.64
Mc3r	Melanocortin 3 receptor	NM_001025270	-1.04	4.27	1.79	1.69	-1.05	-2.61	-1.95
Nmbr	Neuromedin B receptor	NM_012799	-1.15	-1.21	1.49	-1.27	-1.17	-1.21	-2.00
Nmur1	Neuromedin U receptor 1	NM_023100	-7.99	2.52	2.12	7.73	7.85	-2.60	-2.16
Nts_pred.	Neurotensin	XM_216884	1.41	1.53	1.20	-1.13	-2.07	-1.23	-1.75
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	NM_013124	4.52	4.48	1.67	1.36	2.39	1.37	6.47
Pyy	Peptide YY (mapped)	NM_001034080	2.88	2.49	-1.19	-1.13	-1.85	1.02	1.84
Ramp3	Receptor (calcitonin) activity modifying protein 3	NM_020100	1.07	1.07	2.32	-1.27	1.65	-1.27	-1.31
Tnf	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	NM_012675	-1.24	1.53	1.79	2.05	2.45	1.08	1.11
Ucp1	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	NM_012682	-1.29	1.12	1.71	2.23	1.61	1.55	-1.37

QRT-PCR assays of 84 obesity-related genes (Rat Obesity RT² Profiler PCR Array, SuperArray Bioscience, Frederick, MD, USA, <http://www.superarray.com>). A pool of 3 samples containing equal amount of total RNA was realized in each group. Results are expressed as ratio of $2^{-\Delta CT}$ and cut off is <-2 (down regulated genes) and >2 (overexpressed genes). Values above the cut off are indicated in bold.

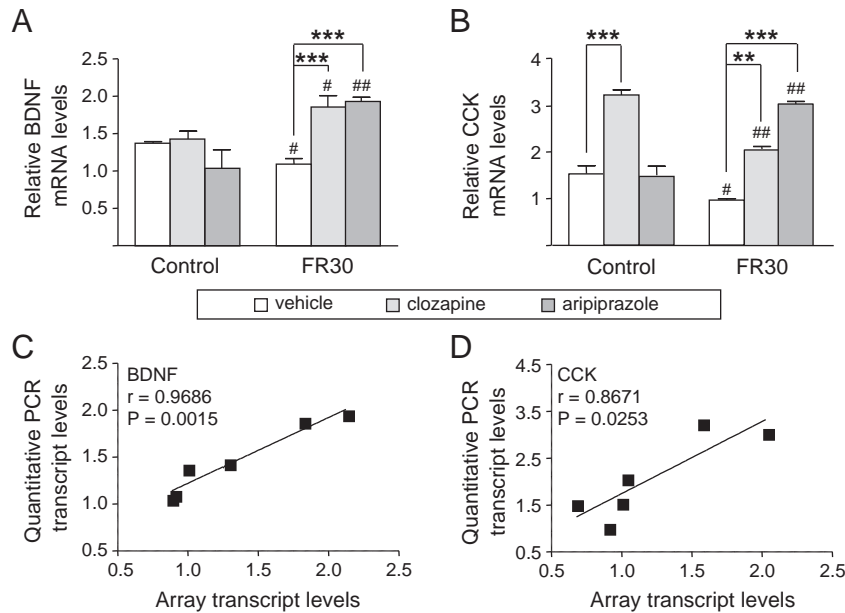


Fig. 5. Brain derived neurotrophic factor (BDNF, A) and cholecystokinin (CCK, B) gene expression measurement using RT-qPCR on individual samples from control and FR30 adult male rat hypothalami. Results are expressed as mean values \pm S.E.M. in male rats after 30 days orally intake of vehicle (\square), clozapine (\blacksquare) or aripiprazole (\blacksquare). The correlations between gene expression measured by PCR array and RT-qPCR experiments are indicated for BDNF (C) and CCK (D), respectively ($n = 4$ rats/group). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, FR30 versus control in the same condition (vehicle, clozapine or aripiprazole); ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, clozapine or aripiprazole versus vehicle in the same group of animals (control or FR30).

stress. In clozapine-treated FR30 rats, at least two conditions may account for hypoglycemia with decreased plasma insulin concentration, *i.e.* improved peripheral glucose utilization and decreased glucose secretion from the liver. Thus, the diminished circulating glucocorticoid level might be responsible to lower glycemia by impairing liver gluconeogenesis (Chrousos, 2000).

The fact that clozapine and aripiprazole caused marked modifications of circulating hormones levels that are actively involved in hypothalamic energy balance regulation, prompted us to investigate the impact of chronic neuroleptic treatments on the hypothalamic expression of several obesity-related genes. We observed that FR30 procedure did not significantly affect the hypothalamic mRNA levels of genes present in our PCR array. In addition, chronic neuroleptic treatments only showed subtle gene expression variations in control animals. This is consistent with the absence of body weight gain and caloric intake differences observed.

In contrast, chronic clozapine and aripiprazole treatments, led to significant modulations of anorexigenic pathways only in FR30 rats, *i.e.* BDNF (Lebrun et al., 2006), CCK (Helm et al., 2003), interleukin (Guijarro et al., 2006) and glucagon receptor (Pocai et al., 2009) that were associated with a decrease of body weight gain and food intake, respectively. This suggests that neurotransmitter systems that are the main hypothalamic target of atypical neuroleptics exhibit long-term programmed alterations in adult male FR30 rats. In line, we have recently noticed that 4-month-old FR30 animals exhibited a significantly increased expression of SLC6A3 (non published data), a dopamine transporter that has been recently shown to be genetically linked to schizophrenia (Cordeiro et al., 2010; Saiz et al., 2010; Talkowski et al., 2008). The fact that we observed a global activation of anorexigenic pathways in FR30 rats, despite the decrease of plasma leptin levels as a normal response to fat decrement, indicates that the hypothalamic signaling mechanisms of leptin may be disrupted by the pharmacological action of these antipsychotics drugs (Reynolds and Kirk, 2010). Accordingly, in rats, it has been reported that clozapine increases BDNF level in the frontal cortex (Balu et al., 2008) and that olanzapine decreases BDNF level in the frontal cortex and hippocampus (Angelucci et al., 2005). In addition of food intake regulation, BDNF is also involved in a wide variety of neural, *i.e.* synaptic plasticity, neuronal

growth and differentiation processes. Interestingly, several reports described reduced BDNF levels in male patients with schizophrenia as well as effects of the BDNF gene Val66Met polymorphism on brain function in schizophrenia and on weight gain in male patients receiving antipsychotics drugs (Balu and Coyle, 2011).

5. Conclusions

Taken together, our results demonstrate that male rat offspring from prenatally undernourished mothers exhibit a modified sensitivity to atypical neuroleptics, reinforcing the idea that some forms of schizophrenia may be acquired during perinatal development. This study may thus help to understand the way by which atypical neuroleptics sensitize schizophrenic patients to the development of metabolic disorders.

Acknowledgments

We would like to thank Novartis (Switzerland) and Bristol-Myers Squibb (France) for providing us with clozapine and aripiprazole, respectively.

References

- Albaugh, V.L., Henry, C.R., Bello, N.T., Hajnal, A., Lynch, S.L., Halle, B., Lynch, C.J., 2006. Hormonal and metabolic effects of olanzapine and clozapine related to body weight in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 14, 36–51.
- Allison, D.B., Fontaine, K.R., Heo, M., Mentore, J.L., Cappelleri, J.C., Chandler, L.P., Weiden, P.J., Cheskin, L.J., 1999. The distribution of body mass index among individuals with and without schizophrenia. *J. Clin. Psychiatry* 60, 215–220.
- Angelucci, F., Aloe, L., Iannitelli, A., Gruber, S.H., Mathe, A.A., 2005. Effect of chronic olanzapine treatment on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 15, 311–317.
- Arjona, A.A., Zhang, S.X., Adamson, B., Wurtman, R.J., 2004. An animal model of antipsychotic-induced weight gain. *Behav. Brain Res.* 152, 121–127.
- Aslanidi, G., Kroutov, V., Philipsberg, G., Lamb, K., Campbell-Thompson, M., Walter, G.A., Kurenov, S., Ignacio Aguirre, J., Keller, P., Hankenson, K., Macdougald, O.A., Zolotukhin, S., 2007. Ectopic expression of Wnt10b decreases adiposity and improves glucose homeostasis in obese rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E726–E736.
- Balu, D.T., Coyle, J.T., 2011. Neuroplasticity signaling pathways linked to the pathophysiology of schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 848–870.
- Balu, D.T., Hoshaw, B.A., Malberg, J.E., Rosenzweig-Lipson, S., Schechter, L.E., Lucki, I., 2008. Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. *Brain Res.* 1211, 37–43.

- Baptista, T., Mata, A., Teneud, L., de Quijada, M., Han, H.W., Hernandez, L., 1993. Effects of long-term administration of clozapine on body weight and food intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 51–54.
- Baptista, T., de Baptista, E.A., Lalonde, J., Plamondon, J., Kin, N.M., Beaulieu, S., Joobar, R., Richard, D., 2004. Comparative effects of the antipsychotics sulpiride and risperidone in female rats on energy balance, body composition, fat morphology and macronutrient selection. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 1305–1311.
- Barker, D.J., 2007. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261, 412–417.
- Basta-Kaim, A., Budziszewska, B., Leskiewicz, M., Fijal, K., Regulska, M., Kubera, M., Wedzony, K., Lason, W., 2011. Hyperactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in lipopolysaccharide-induced neurodevelopmental model of schizophrenia in rats: effects of antipsychotic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 586–595.
- Best, L., Yates, A.P., Reynolds, G.P., 2005. Actions of antipsychotic drugs on pancreatic beta-cell function: contrasting effects of clozapine and haloperidol. *J. Psychopharmacol.* 19, 597–601.
- Breton, C., Lukaszewski, M.A., Risold, P.Y., Enache, M., Guillemot, J., Riviere, G., Delahaye, F., Lesage, J., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., Vieau, D., 2009. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E462–E472.
- Brooks III, J.O., Chang, H.S., Krasnykh, O., 2009. Metabolic risks in older adults receiving second-generation antipsychotic medication. *Curr. Psychiatry Rep.* 11, 33–40.
- Brown, A.S., Susser, E.S., 2008. Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 34, 1054–1063.
- Casper, R.C., 2004. Nutrients, neurodevelopment, and mood. *Curr. Psychiatry Rep.* 6, 425–429.
- Choi, S., DiSilvio, B., Unangst, J., Fernstrom, J.D., 2007. Effect of chronic infusion of olanzapine and clozapine on food intake and body weight gain in male and female rats. *Life Sci.* 81, 1024–1030.
- Chrousos, G.P., 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24 (Suppl 2), S50–S55.
- Cooper, G.D., Harrold, J.A., Halford, J.C., Goudie, A.J., 2008. Chronic clozapine treatment in female rats does not induce weight gain or metabolic abnormalities but enhances adiposity: implications for animal models of antipsychotic-induced weight gain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 428–436.
- Cordeiro, Q., Siqueira-Roberto, J., Vallada, H., 2010. Association between the SLC6A3 A1343G polymorphism and schizophrenia. *Arq. Neuropsiquiatr.* 68, 716–719.
- Fell, M.J., Marshall, K.M., Williams, J., Neill, J.C., 2004. Effects of the atypical antipsychotic olanzapine on reproductive function and weight gain in female rats. *J. Psychopharmacol.* 18, 149–155.
- Ferno, J., Vik-Mo, A.O., Jassim, G., Havik, B., Berge, K., Skrede, S., Gudbrandsen, O.A., Waage, J., Lunder, N., Mork, S., Berge, R.K., Jorgensen, H.A., Steen, V.M., 2009. Acute clozapine exposure in vivo induces lipid accumulation and marked sequential changes in the expression of SREBP, PPAR, and LXR target genes in rat liver. *Psychopharmacology (Berl.)* 203, 73–84.
- Goudie, A.J., Smith, J.A., Halford, J.C., 2002. Characterization of olanzapine-induced weight gain in rats. *J. Psychopharmacol.* 16, 291–296.
- Guijarro, A., Laviano, A., Meguid, M.M., 2006. Hypothalamic integration of immune function and metabolism. *Prog. Brain Res.* 153, 367–405.
- Helm, K.A., Rada, P., Hoebel, B.G., 2003. Cholecystokinin combined with serotonin in the hypothalamus limits accumbens dopamine release while increasing acetylcholine: a possible satiation mechanism. *Brain Res.* 963, 290–297.
- Hung, C.C., Wei, I.H., Huang, C.C., 2009. Late-onset cholestatic hepatitis induced by olanzapine in a patient with schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 1574–1575.
- Inoue, A., Seto, M., Sugita, S., Hide, I., Hirose, T., Koga, N., Kikuchi, T., Nakata, Y., 1998. Differential effects on D2 dopamine receptor and prolactin gene expression by haloperidol and aripiprazole in the rat pituitary. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 55, 285–292.
- Johnson, D.E., Yamazaki, H., Ward, K.M., Schmidt, A.W., Lebel, W.S., Treadway, J.L., Gibbs, E.M., Zawulich, W.S., Rollema, H., 2005. Inhibitory effects of antipsychotics on carbachol-enhanced insulin secretion from perfused rat islets: role of muscarinic antagonism in antipsychotic-induced diabetes and hyperglycemia. *Diabetes* 54, 1552–1558.
- Jordan, S., Koprivica, V., Dunn, R., Tottori, K., Kikuchi, T., Altar, C.A., 2004. In vivo effects of aripiprazole on cortical and striatal dopaminergic and serotonergic function. *Eur. J. Pharmacol.* 483, 45–53.
- Lauressergues, E., Staelens, B., Vaille, K., Majd, Z., Hum, D.W., Duriez, P., Cussac, D., 2010. Antipsychotic drug action on SREBPs-related lipogenesis and cholesterol synthesis in primary rat hepatocytes. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 381, 427–439.
- Lebrun, B., Bariohay, B., Moyse, E., Jean, A., 2006. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: a minireview. *Auton. Neurosci.* 126–127, 30–38.
- Lee, M.D., Clifton, P.G., 2002. Meal patterns of free feeding rats treated with clozapine, olanzapine, or haloperidol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 147–154.
- Lesage, J., Sebaai, N., Leonhardt, M., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Deloof, S., Vieau, D., 2006. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 9, 183–198.
- Minet-Ringuet, J., Even, P.C., Valet, P., Carpeno, C., Visentin, V., Prevot, D., Daviaud, D., Quignard-Boulange, A., Tome, D., de Beaurepaire, R., 2007. Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. *Mol. Psychiatry* 12, 562–571.
- Murashita, M., Kusumi, I., Hosoda, H., Kangawa, K., Koyama, T., 2007. Acute administration of clozapine concurrently increases blood glucose and circulating plasma ghrelin levels in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32, 777–784.
- Newcomer, J.W., 2007. Metabolic syndrome and mental illness. *Am. J. Manag. Care* 13, S170–S177.
- Pocai, A., Carrington, P.E., Adams, J.R., Wright, M., Eiermann, G., Zhu, L., Du, X., Petrov, A., Lassman, M.E., Jiang, G., Liu, F., Miller, C., Tota, L.M., Zhou, G., Zhang, X., Sountis, M.M., Santoprete, A., Capito, E., Chicchi, G.G., Thornberry, N., Bianchi, E., Pessi, A., Marsh, D.J., SinhaRoy, R., 2009. Glucagon-like peptide 1/glucagon receptor dual agonism reverses obesity in mice. *Diabetes* 58, 2258–2266.
- Pouzet, B., Mow, T., Kreilgaard, M., Velschow, S., 2003. Chronic treatment with antipsychotics in rats as a model for antipsychotic-induced weight gain in human. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 133–140.
- Reynolds, G.P., Kirk, S.L., 2010. Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment—pharmacological mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 125, 169–179.
- Riviere, G., Michaud, A., Breton, C., VanCamp, G., Laborie, C., Enache, M., Lesage, J., Deloof, S., Corvol, P., Vieau, D., 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension* 46, 1169–1174.
- Ryan, M.C., Collins, P., Thakore, J.H., 2003. Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naïve patients with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 160, 284–289.
- Saiz, P.A., Garcia-Portilla, M.P., Arango, C., Morales, B., Arias, B., Corcoran, P., Fernandez, J.M., Alvarez, V., Coto, E., Bascaran, M.T., Bousono, M., Fananas, L., Bobes, J., 2010. Genetic polymorphisms in the dopamine-2 receptor (DRD2), dopamine-3 receptor (DRD3), and dopamine transporter (SLC6A3) genes in schizophrenia: data from an association study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 26–31.
- Savoy, Y.E., Ashton, M.A., Miller, M.W., Nedza, F.M., Spracklin, D.K., Hawthorn, M.H., Rollema, H., Matos, F.F., Hajos-Korcsok, E., 2010. Differential effects of various typical and atypical antipsychotics on plasma glucose and insulin levels in the mouse: evidence for the involvement of sympathetic regulation. *Schizophr. Bull.* 36, 410–418.
- Sebaai, N., Lesage, J., Breton, C., Vieau, D., Deloof, S., 2004. Perinatal food deprivation induces marked alterations of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in 8-month-old male rats both under basal conditions and after a dehydration period. *Neuroendocrinology* 79, 163–173.
- Susser, E., St Clair, D., He, L., 2008. Latent effects of prenatal malnutrition on adult health: the example of schizophrenia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1136, 185–192.
- Talkowski, M.E., Kirov, G., Bamne, M., Georgieva, L., Torres, G., Mansour, H., Chowdari, K.V., Milanova, V., Wood, J., McClain, L., Prasad, K., Shirts, B., Zhang, J., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., Devlin, B., Nimgaonkar, V.L., 2008. A network of dopaminergic gene variations implicated as risk factors for schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 17, 747–758.
- Thakore, J.H., Mann, J.N., Vlahos, I., Martin, A., Reznik, R., 2002. Increased visceral fat distribution in drug-naïve and drug-free patients with schizophrenia. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 137–141.
- Thornton-Jones, Z., Neill, J.C., Reynolds, G.P., 2002. The atypical antipsychotic olanzapine enhances ingestive behaviour in the rat: a preliminary study. *J. Psychopharmacol.* 16, 35–37.
- Tulipano, G., Rizzetti, C., Bianchi, I., Fanzani, A., Spano, P., Cocchi, D., 2007. Clozapine-induced alteration of glucose homeostasis in the rat: the contribution of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *Neuroendocrinology* 85, 61–70.
- Wahlbeck, K., Forsen, T., Osmond, C., Barker, D.J., Eriksson, J.G., 2001. Association of schizophrenia with low maternal body mass index, small size at birth, and thinness during childhood. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 48–52.
- Walker, E., Mittal, V., Tessner, K., 2008. Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 4, 189–216.
- Xu, M.Q., Sun, W.S., Liu, B.X., Feng, G.Y., Yu, L., Yang, L., He, G., Sham, P., Susser, E., St Clair, D., He, L., 2009. Prenatal malnutrition and adult schizophrenia: further evidence from the 1959–1961 Chinese famine. *Schizophr. Bull.* 35, 568–576.
- Yamauchi, T., Tsumi, K., Makinodan, M., Kimoto, S., Toritsuka, M., Okuda, H., Kishimoto, T., Wanaka, A., 2010. Olanzapine increases cell mitotic activity and oligodendrocyte-lineage cells in the hypothalamus. *Neurochem. Int.* 57, 565–571.
- Yang, L.H., Chen, T.M., Yu, S.T., Chen, Y.H., 2007. Olanzapine induces SREBP-1-related adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Pharmacol. Res.* 56, 202–208.

Des études ont montré que la DM induisant un RCIU, augmente la prévalence de la schizophrénie chez l'adulte (Xu 2009 prénatal). Le traitement par des antipsychotiques de 2nde génération, bien qu'efficace contre la schizophrénie, entraîne de nombreuses modifications métaboliques chez le patient, telles que l'obésité, le diabète de type 2 et autres pathologies liées au syndrome métabolique (SM). La DM est également connue pour induire l'apparition du SM chez l'adulte (Barker 1993). Ces observations suggèrent que **la schizophrénie aurait une origine neuro-développementale et que la DM pourrait être un lien entre la schizophrénie et les pathologies liées au SM** observées chez certains patients.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons testé les effets d'un traitement de 4 semaines à l'aripiprazole ou à la clozapine sur les paramètres métabolique chez les rats mâles FR30 adultes.

Les neuroleptiques utilisés ne modifient pas le poids des animaux FR30 ni leur prise alimentaire. Cependant, la clozapine et l'aripiprazole diminuent la sécrétion de corticostérone chez les rats mâles adultes FR30. La clozapine réduit également la sécrétion de leptine ainsi que la glycémie. De plus, ces neuroleptiques modulent l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique au niveau de l'hypothalamus, mais de manière différentielle entre les rats T et FR30.

Bien que ni clozapine ni l'aripiprazole n'induisent d'altérations métaboliques marquées chez les rats FR30 et T, l'ensemble de nos travaux montrent que les animaux FR30 présentent une sensibilité différente aux neuroleptiques de 2nde génération. Nos résultats ne réfutent cependant pas l'hypothèse selon laquelle la schizophrénie aurait une origine développementale et ouvrent de nouvelles perspectives de recherche sur la sensibilité des patients schizophrènes à développer des pathologies métaboliques.

Références

- A -

- Adrian, T. E., Ferri, G. L., Bacarese-Hamilton, A. J., Fuessl, H. S., Polak, J. M., and Bloom, S. R. (1985). Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology* *89*, 1070–1077.
- Ahima, R. S., Bjorbaek, C., Osei, S., and Flier, J. S. (1999). Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* *140*, 2755–2762.
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., and Flier, J. S. (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J. Clin. Invest.* *101*, 1020–1027.
- Ahima, R. S., Qi, Y., and Singhal, N. S. (2006). Adipokines that link obesity and diabetes to the hypothalamus. *Prog. Brain Res.* *153*, 155–174.
- Air, E. L., Strowski, M. Z., Benoit, S. C., Conarello, S. L., Salituro, G. M., Guan, X.-M., Liu, K., Woods, S. C., and Zhang, B. B. (2002). Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat. Med* *8*, 179–183.
- Alonso-Vale, M. I. C., Andreotti, S., Mukai, P. Y., Borges-Silva, C. das N., Peres, S. B., Cipolla-Neto, J., and Lima, F. B. (2008). Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *J. Pineal Res.* *45*, 422–429.
- Amusquivar, E., Laws, J., Clarke, L., and Herrera, E. (2010). Fatty acid composition of the maternal diet during the first or the second half of gestation influences the fatty acid composition of sows' milk and plasma, and plasma of their piglets. *Lipids* *45*, 409–418.
- Ando, H., Ushijima, K., Yanagihara, H., Hayashi, Y., Takamura, T., Kaneko, S., and Fujimura, A. (2009). Clock gene expression in the liver and adipose tissues of non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Clin. Exp. Hypertens.* *31*, 201–207.
- Ando, H., Yanagihara, H., Hayashi, Y., Obi, Y., Tsuruoka, S., Takamura, T., Kaneko, S., and Fujimura, A. (2005). Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology* *146*, 5631–5636.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., et al. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *86*, 4753–4758.
- Arora, S., and Anubhuti (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides* *40*, 375–401.

- Arvat, E., Maccario, M., Di Vito, L., Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Papotti, M., Muccioli, G., Dieguez, C., Casanueva, F. F., et al. (2001). Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 1169–1174.
- Asnicar, M. A., Smith, D. P., Yang, D. D., Heiman, M. L., Fox, N., Chen, Y. F., Hsiung, H. M., and Köster, A. (2001). Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology* 142, 4394–4400.
- Aubert, R., Suquet, J. P., and Lemonnier, D. (1980). Long-term morphological and metabolic effects of early under- and over-nutrition in mice. *J. Nutr* 110, 649–661.

- B -

- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, M. N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., et al. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790–793.
- Bagdade, J. D., Bierman, E. L., and Porte, D., Jr (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J. Clin. Invest* 46, 1549–1557.
- Bai, Y., Zhang, S., Kim, K. S., Lee, J. K., and Kim, K. H. (1996). Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J. Biol. Chem* 271, 13939–13942.
- Baile, C. A., McLaughlin, C. L., and Della-Fera, M. A. (1986). Role of cholecystokinin and opioid peptides in control of food intake. *Physiol. Rev* 66, 172–234.
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73–82.
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G., and Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344–2347.
- Banks, A. S., Davis, S. M., Bates, S. H., and Myers, M. G., Jr (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 14563–14572.
- Banks, W. A. (2004). The source of cerebral insulin. *Eur. J. Pharmacol* 490, 5–12.
- Banks, W. A., Kastin, A. J., Huang, W., Jaspan, J. B., and Maness, L. M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305–311.

- Banno, R., Zimmer, D., De Jonghe, B. C., Atienza, M., Rak, K., Yang, W., and Bence, K. K. (2010). PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 720–734.
- Barker, D. J. P. (2004). The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* 93, 26–33.
- Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., and Wadsworth, M. E. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298, 564–567.
- Baschat, A. A., and Hecher, K. (2004). Fetal growth restriction due to placental disease. *Semin. Perinatol* 28, 67–80.
- Baskin, D. G., Breininger, J. F., and Schwartz, M. W. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48, 828–833.
- Bastard, J. P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., Vidal, H., and Hainque, B. (2000). Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3338–3342.
- Batterham, R. L., Cowley, M. A., Small, C. J., Herzog, H., Cohen, M. A., Dakin, C. L., Wren, A. M., Brynes, A. E., Low, M. J., Ghatei, M. A., et al. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650–654.
- Batterham, R. L., Heffron, H., Kapoor, S., Chivers, J. E., Chandarana, K., Herzog, H., Le Roux, C. W., Thomas, E. L., Bell, J. D., and Withers, D. J. (2006). Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab* 4, 223–233.
- Bayol, S. A., Simbi, B. H., and Stickland, N. C. (2005). A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J. Physiol. (Lond.)* 567, 951–961.
- Bayol, S. A., Simbi, B. H., Bertrand, J. A., and Stickland, N. C. (2008). Offspring from mothers fed a “junk food” diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 3219–3230.
- Beck, B. (2001). KO’s and organisation of peptidergic feeding behavior mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 25, 143–158.
- Beck, B., Stricker-Krongrad, A., Richy, S., and Burlet, C. (1998). Evidence that hypothalamic neurotensin signals leptin effects on feeding behavior in normal and fat-preferring rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 252, 634–638.
- Benediktsson, R., Lindsay, R. S., Noble, J., Seckl, J. R., and Edwards, C. R. (1993). Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 341, 339–341.

- Bereiter, D. A., and Jeanrenaud, B. (1980). Altered dendritic orientation of hypothalamic neurons from genetically obese (ob/ob) mice. *Brain Res.* 202, 201–206.
- Bereiter, D. A., and Jeanrenaud, B. (1979). Altered neuroanatomical organization in the central nervous system of the genetically obese (ob/ob) mouse. *Brain Res.* 165, 249–260.
- Bernard, C. (1865). *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* (J. B. Baillière et fils).
- Bernardis, L. L., and Bellinger, L. L. (1998). The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 218, 284–306.
- Bernardis, L. L., and Bellinger, L. L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 20, 189–287.
- Bertin, E., Gangnerau, M.-N., Bellon, G., Bailbé, D., Arbelot De Vacqueur, A., and Portha, B. (2002). Development of beta-cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in last trimester of pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 283, R623–R630.
- Bi, S., Gavrilova, O., Gong, D. W., Mason, M. M., and Reitman, M. (1997). Identification of a placental enhancer for the human leptin gene. *J. Biol. Chem* 272, 30583–30588.
- Bieswal, F., Ahn, M.-T., Reusens, B., Holvoet, P., Raes, M., Rees, W. D., and Remacle, C. (2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)* 14, 1330–1343.
- Bieswal, F., Hay, S. M., McKinnon, C., Reusens, B., Cuignet, M., Rees, W. D., and Remacle, C. (2004). Prenatal protein restriction does not affect the proliferation and differentiation of rat preadipocytes. *J. Nutr.* 134, 1493–1499.
- Bispham, J., Gardner, D. S., Gnanalingham, M. G., Stephenson, T., Symonds, M. E., and Budge, H. (2005). Maternal nutritional programming of fetal adipose tissue development: differential effects on messenger ribonucleic acid abundance for uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated and prolactin receptors. *Endocrinology* 146, 3943–3949.
- Bol, V. V., Delattre, A.-I., Reusens, B., Raes, M., and Remacle, C. (2009). Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R291–R299.
- Bol, V. V., Reusens, B. M., and Remacle, C. A. (2008). Postnatal catch-up growth after fetal protein restriction programs proliferation of rat preadipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 16, 2760–2763.
- Bouret, S. G. (2009). Early Life Origins of Obesity: Role of Hypothalamic Programming. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 48, S31–S38.

- Bouret, S. G., and Simerly, R. B. (2007). Development of leptin-sensitive circuits. *J. Neuroendocrinol.* *19*, 575–582.
- Bouret, S. G., and Simerly, R. B. (2006). Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin. Genet.* *70*, 295–301.
- Bouret, S. G., Draper, S. J., and Simerly, R. B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* *304*, 108–110.
- Bouret, S. G., Gorski, J. N., Patterson, C. M., Chen, S., Levin, B. E., and Simerly, R. B. (2008). Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell Metab.* *7*, 179–185.
- Bowers, R. R., Festuccia, W. T. L., Song, C. K., Shi, H., Migliorini, R. H., and Bartness, T. J. (2004). Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* *286*, R1167–R1175.
- Bray, M. S., and Young, M. E. (2007). Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev* *8*, 169–181.
- Brosnan, J. T., and Brosnan, M. E. (2006). The sulfur-containing amino acids: an overview. *J. Nutr* *136*, 1636S-1640S.
- Buckley, A. J., Keserü, B., Briody, J., Thompson, M., Ozanne, S. E., and Thompson, C. H. (2005). Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metab. Clin. Exp* *54*, 500–507.
- Burrin, D. G., Wester, T. J., Davis, T. A., Fiorotto, M. L., and Chang, X. (1999). Dexamethasone inhibits small intestinal growth via increased protein catabolism in neonatal pigs. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* *276*, E269–E277.

- C -

- Carraway, R., and Leeman, S. E. (1973). The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J. Biol. Chem* *248*, 6854–6861.
- Casabiell, X., Piñeiro, V., Tomé, M. A., Peinó, R., Diéguez, C., and Casanueva, F. F. (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *82*, 4270–4273.
- Van Cauter, E., Polonsky, K. S., and Scheen, A. J. (1997). Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocr. Rev.* *18*, 716–738.

- Chang, G.-Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., and Leibowitz, S. F. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J. Neurosci.* *28*, 12107–12119.
- Chang, L., Chiang, S.-H., and Saltiel, A. R. (2004). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol. Med* *10*, 65–71.
- Charrière, G., Cousin, B., Arnaud, E., André, M., Bacou, F., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2003). Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J. Biol. Chem* *278*, 9850–9855.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Wolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Moore, K. J., Breitbart, R. E., et al. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* *84*, 491–495.
- Chen, J., Scott, K. A., Zhao, Z., Moran, T. H., and Bi, S. (2008). Characterization of the feeding inhibition and neural activation produced by dorsomedial hypothalamic cholecystokinin administration. *Neuroscience* *152*, 178–188.
- Chen, X., Lin, J., Hausman, D. B., Martin, R. J., Dean, R. G., and Hausman, G. J. (2000). Alterations in fetal adipose tissue leptin expression correlate with the development of adipose tissue. *Biol. Neonate* *78*, 41–47.
- Choi, S., and Dallman, M. F. (1999). Hypothalamic obesity: multiple routes mediated by loss of function in medial cell groups. *Endocrinology* *140*, 4081–4088.
- Cinti, S. (1999). Adipose tissues and obesity. *Ital J Anat Embryol* *104*, 37–51.
- Clark, J. T., Kalra, P. S., Crowley, W. R., and Kalra, S. P. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* *115*, 427–429.
- Cleasby, M. E., Kelly, P. A. T., Walker, B. R., and Seckl, J. R. (2003). Programming of rat muscle and fat metabolism by in utero overexposure to glucocorticoids. *Endocrinology* *144*, 999–1007.
- Codo, W., and Carlini, E. A. (1979). Postnatal undernutrition in rats: attempts to develop alternative methods to food deprive pups without maternal behavioral alteration. *Dev Psychobiol* *12*, 475–484.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Obici, S., Scherer, P. E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J. Clin. Invest* *108*, 1875–1881.
- Conlon, J. M. (2002). The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides* *23*, 269–278.

- Correia, M. L. G., Haynes, W. G., Rahmouni, K., Morgan, D. A., Sivitz, W. I., and Mark, A. L. (2002). The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes* 51, 439–442.
- Corwin, R. L., Rowe, P. M., and Crawley, J. N. (1995). Galanin and the galanin antagonist M40 do not change fat intake in a fat-chow choice paradigm in rats. *Am. J. Physiol* 269, R511–R518.
- Couceyro, P. R., Koylu, E. O., and Kuhar, M. J. (1997). Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J. Chem. Neuroanat* 12, 229–241.
- Coupé, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A., and Parnet, P. (2010). Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 151, 702–713.
- Crespi, E. J., Vaudry, H., and Denver, R. J. (2004). Roles of corticotropin-releasing factor, neuropeptide Y and corticosterone in the regulation of food intake in *Xenopus laevis*. *J. Neuroendocrinol* 16, 279–288.
- Cripps, R. L., Martin-Gronert, M. S., Archer, Z. A., Hales, C. N., Mercer, J. G., and Ozanne, S. E. (2009). Programming of hypothalamic neuropeptide gene expression in rats by maternal dietary protein content during pregnancy and lactation. *Clin. Sci.* 117, 85–93.
- Csaba, G. (1980). Phylogeny and ontogeny of hormone receptors: the selection theory of receptor formation and hormonal imprinting. *Biol Rev Camb Philos Soc* 55, 47–63.
- Cummings, D. E., Purnell, J. Q., Frayo, R. S., Schmidova, K., Wisse, B. E., and Weigle, D. S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714–1719.
- Cusack, B., McCormick, D. J., Pang, Y. P., Souder, T., Garcia, R., Fauq, A., and Richelson, E. (1995). Pharmacological and biochemical profiles of unique neurotensin 8-13 analogs exhibiting species selectivity, stereoselectivity, and superagonism. *J. Biol. Chem* 270, 18359–18366.

- D -

- Dahri, S., Snoeck, A., Reusens-Billen, B., Remacle, C., and Hoet, J. J. (1991). Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 40 Suppl 2, 115–120.
- Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Lin, J. K., Farzadfar, F., Khang, Y.-H., Stevens, G. A., et al. (2011). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378, 31–40.

- Dardente, H., and Cermakian, N. (2007). Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol. Int.* 24, 195–213.
- Datta, S., Patterson, E. H., Vincitore, M., Tonkiss, J., Morgane, P. J., and Galler, J. R. (2000). Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep/wake behavior as adults. *J Sleep Res* 9, 71–79.
- Davidowa, H., and Plagemann, A. (2007). Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport* 18, 521–524.
- Davidowa, H., Li, Y., and Plagemann, A. (2003). Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. *Eur. J. Neurosci.* 18, 613–621.
- Dechiara, T. M., Efstratiadis, A., and Robertson, E. J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345, 78–80.
- Delahaye, F., Breton, C., Risold, P.-Y., Enache, M., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., Lesage, J., and Vieau, D. (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 149, 470–475.
- Delahaye, F., Lukaszewski, M.-A., Watzet, J.-S., Cisse, O., Dutriez-Casteloot, I., Fajardy, I., Montel, V., Dickes-Coopman, A., Laborie, C., Lesage, J., et al. (2010). Maternal perinatal undernutrition programs a “brown-like” phenotype of gonadal white fat in male rat at weaning. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R101–R110.
- Desai, M., Crowther, N. J., Lucas, A., and Hales, C. N. (1996). Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br. J. Nutr* 76, 591–603.
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J., and Ross, M. G. (2005). Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R91–R96.
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J., and Ross, M. G. (2007a). The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 555.e1–e7.
- Desai, M., Gayle, D., Han, G., and Ross, M. G. (2007b). Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod Sci* 14, 329–337.
- Desai, M., Guang Han, Ferelli, M., Kallichanda, N., and Lane, R. H. (2008). Programmed upregulation of adipogenic transcription factors in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod Sci* 15, 785–796.
- Diamond, P., Doran, P., Brady, H. R., and McGinty, A. (2000). Suppressors of cytokine signalling (SOCS): putative modulators of cytokine bioactivity in health and disease. *J. Nephrol.* 13, 9–14.

- Van Dielen, F. M., van't Veer, C., Schols, A. M., Soeters, P. B., Buurman, W. A., and Greve, J. W. (2001). Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 1759–1766.
- Doi, M., Hirayama, J., and Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 125, 497–508.
- Dorner, G. (1974). Environment-dependent brain differentiation and fundamental processes of life. *Acta Biol. Med. Ger* 33, 129–148.
- Drake, A. J., Raubenheimer, P. J., Kerrigan, D., McInnes, K. J., Seckl, J. R., and Walker, B. R. (2010). Prenatal dexamethasone programs expression of genes in liver and adipose tissue and increased hepatic lipid accumulation but not obesity on a high-fat diet. *Endocrinology* 151, 1581–1587.
- Draper, N., Echwald, S. M., Lavery, G. G., Walker, E. A., Fraser, R., Davies, E., Sørensen, T. I. A., Astrup, A., Adamski, J., Hewison, M., et al. (2002). Association studies between microsatellite markers within the gene encoding human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and body mass index, waist to hip ratio, and glucocorticoid metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 4984–4990.
- Dryden, S., Pickavance, L., Frankish, H. M., and Williams, G. (1995). Increased neuropeptide Y secretion in the hypothalamic paraventricular nucleus of obese (fa/fa) Zucker rats. *Brain Res* 690, 185–188.
- Dugail, I., Quignard-Boulangé, A., and Dupuy, F. (1986). Role of adipocyte precursors in the onset of obesity induced by overfeeding in suckling rats. *J. Nutr.* 116, 524–535.
- Dumont, Y., Fournier, A., and Quirion, R. (1998). Expression and characterization of the neuropeptide Y Y5 receptor subtype in the rat brain. *J. Neurosci* 18, 5565–5574.
- Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Coupé, B., Hawchar, O., Enache, M., Dickes-Coopman, A., Keyzer, Y. de, Deloof, S., Lesage, J., and Vieau, D. (2008). Tissue-specific programming expression of glucocorticoid receptors and 11 beta-HSDs by maternal perinatal undernutrition in the HPA axis of adult male rats. *Horm. Metab. Res.* 40, 257–261.

- E -

- Edwards, C. M., Abusnana, S., Sunter, D., Murphy, K. G., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (1999). The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J. Endocrinol* 160, R7–R12.
- Efstratiadis, A. (1998). Genetics of mouse growth. *Int. J. Dev. Biol* 42, 955–976.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H., and Bray, G. A. (1993). Effect of beta-endorphin on sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue. *Am. J. Physiol* 264, R109–R115.

- Ekblad, E., and Sundler, F. (2002). Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides* 23, 251–261.
- El-Haschimi, K., Pierroz, D. D., Hileman, S. M., Bjørbaek, C., and Flier, J. S. (2000). Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest* 105, 1827–1832.
- Elmqvist, J. K., Ahima, R. S., Elias, C. F., Flier, J. S., and Saper, C. B. (1998). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 741–746.
- Erhuma, A., Salter, A. M., Sculley, D. V., Langley-Evans, S. C., and Bennett, A. J. (2007). Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1702–E1714.
- Eriksson, J. G., Forsén, T., Tuomilehto, J., Osmond, C., and Barker, D. J. P. (2003). Early adiposity rebound in childhood and risk of Type 2 diabetes in adult life. *Diabetologia* 46, 190–194.
- Ervin, R. B. (2009). Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *Natl Health Stat Report*, 1–7.

- F -

- Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., and Bahouth, S. W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273–2282.
- Fekete, C., Sarkar, S., Rand, W. M., Harney, J. W., Emerson, C. H., Bianco, A. C., and Lechan, R. M. (2002). Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology* 143, 3846–3853.
- Fenton, T. R. (2003). A new growth chart for preterm babies: Babson and Benda's chart updated with recent data and a new format. *BMC Pediatr* 3, 13.
- Férézou-Viala, J., Roy, A.-F., Sérougne, C., Gripois, D., Parquet, M., Bailleux, V., Gertler, A., Delplanque, B., Djiane, J., Riottot, M., et al. (2007). Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293, R1056–R1062.
- Finkelstein, J. D. (1998). The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur. J. Pediatr* 157 Suppl 2, S40–S44.

- Fontaine, C., Dubois, G., Duguay, Y., Helledie, T., Vu-Dac, N., Gervois, P., Soncin, F., Mandrup, S., Fruchart, J.-C., Fruchart-Najib, J., et al. (2003). The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* *278*, 37672–37680.
- Fontbonne, A., Thibault, N., Eschwège, E., and Ducimetière, P. (1992). Body fat distribution and coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes mellitus: the Paris Prospective Study, 15-year follow-up. *Diabetologia* *35*, 464–468.
- Forsdahl, A. (1977). Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med* *31*, 91–95.
- Fowden, A. L. (1995). Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod. Fertil. Dev* *7*, 351–363.
- Fowden, A. L., and Forhead, A. J. (2004). Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* *127*, 515–526.
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., and Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med* *1*, 1311–1314.
- Fride, E., Bregman, T., and Kirkham, T. C. (2005). Endocannabinoids and food intake: newborn suckling and appetite regulation in adulthood. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* *230*, 225–234.
- Fried, S. K., Bunkin, D. A., and Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 847–850.
- Friedman, J. M., and Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* *395*, 763–770.
- Froy, O. (2011). The circadian clock and metabolism. *Clin. Sci.* *120*, 65–72.
- Funahashi, H., Hori, T., Shimoda, Y., Mizushima, H., Ryushi, T., Katoh, S., and Shioda, S. (2000). Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus. *Regul. Pept* *92*, 31–35.

- G -

- Gambling, L., Dunford, S., Wallace, D. I., Zuur, G., Solanky, N., Srail, S. K. S., and McArdle, H. J. (2003). Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat. *J. Physiol. (Lond.)* *552*, 603–610.
- Garofano, A., Czernichow, P., and Bréant, B. (1999). Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia* *42*, 711–718.

- Garofano, A., Czernichow, P., and Bréant, B. (1997). In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 40, 1231–1234.
- Ge, H., Huang, L., Pourbahrami, T., and Li, C. (2002). Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem* 277, 45898–45903.
- Géloën, A., Collet, A. J., Guay, G., and Bukowiecki, L. J. (1989). Insulin stimulates in vivo cell proliferation in white adipose tissue. *Am. J. Physiol* 256, C190–C196.
- Genuth, S., Alberti, K. G. M. M., Bennett, P., Buse, J., Defronzo, R., Kahn, R., Kitzmiller, J., Knowler, W. C., Lebovitz, H., Lernmark, A., et al. (2003). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26, 3160–3167.
- Gibbs, J., Young, R. C., and Smith, G. P. (1973). Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 84, 488–495.
- Girard, J., Perdereau, D., Foufelle, F., Prip-Buus, C., and Ferré, P. (1994). Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J* 8, 36–42.
- Glass, M. J., Chan, J., and Pickel, V. M. (2002). Ultrastructural localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat medial nucleus tractus solitarius: relationships with neuropeptide Y or catecholamine neurons. *J. Neurosci. Res* 67, 753–765.
- Grill, H. J., and Smith, G. P. (1988). Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats. *Am. J. Physiol* 254, R853–R856.
- Grimble, R. F. (2002). Inflammatory status and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 551–559.
- Gu, H., Liu, L., Ma, S., Liu, Y., Ren, Y., Zhai, L., Yu, F., An, L., and Yang, J. (2009). Inhibition of SOCS-3 in adipocytes of rats with diet-induced obesity increases leptin-mediated fatty acid oxidation. *Endocrine* 36, 546–554.
- Guan, H., Arany, E., van Beek, J. P., Chamson-Reig, A., Thyssen, S., Hill, D. J., and Yang, K. (2005). Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E663–E673.
- Guo, F., and Jen, K. L. (1995). High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol. Behav.* 57, 681–686.
- Gupta, A., Srinivasan, M., Thamadilok, S., and Patel, M. S. (2009). Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *J. Endocrinol.* 200, 293–300.

- H -

- Haffner, S. M., Valdez, R. A., Hazuda, H. P., Mitchell, B. D., Morales, P. A., and Stern, M. P. (1992). Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 41, 715–722.
- Håkansson, M. L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R. C., and Meister, B. (1998). Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J. Neurosci* 18, 559–572.
- Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K., and Friedman, J. M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543–546.
- Hales, C. N., and Barker, D. J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595–601.
- Halford, J. C. G., Harrold, J. A., Boyland, E. J., Lawton, C. L., and Blundell, J. E. (2007). Serotonergic drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs* 67, 27–55.
- Hamed, E. A., Zakary, M. M., Ahmed, N. S., and Gamal, R. M. (2011). Circulating leptin and insulin in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: Relation to ghrelin and oxidative stress. *Diabetes Research and Clinical Practice*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924513> [Accessed September 27, 2011].
- Harman-Boehm, I., Blüher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Klötting, N., Stumvoll, M., Bashan, N., et al. (2007). Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 92, 2240–2247.
- Harvey, J., Solovyova, N., and Irving, A. (2006). Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Prog. Lipid Res.* 45, 369–378.
- Hausberger, F. X., and Widelitz, M. M. (1963). Distribution of labeled erythrocytes in adipose tissue and muscle in the rat. *Am. J. Physiol* 204, 649–652.
- Hausman, G. J., Wright, J. T., Latimer, A., Watson, R., and Martin, R. J. (1993). The influence of human growth hormone (GH) and thyroxine (T4) on the differentiation of adipose tissue in the fetus. *Obes. Res* 1, 345–356.
- Haynes, A. C., Jackson, B., Overend, P., Buckingham, R. E., Wilson, S., Tadayyon, M., and Arch, J. R. (1999). Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20, 1099–1105.
- Heid, I. M., Wagner, S. A., Gohlke, H., Iglseider, B., Mueller, J. C., Cip, P., Ladurner, G., Reiter, R., Stadlmayr, A., Mackevics, V., et al. (2006). Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. *Diabetes* 55, 375–384.

- Heiman, M. L., Ahima, R. S., Craft, L. S., Schoner, B., Stephens, T. W., and Flier, J. S. (1997). Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 138, 3859–3863.
- Hendrix, N., and Berghella, V. (2008). Non-Placental Causes of Intrauterine Growth Restriction. *Seminars in Perinatology* 32, 161–165.
- Horvath, T. L. (2006). Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5, 228S-233S.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.
- Hotta, K., Kitamoto, T., Kitamoto, A., Mizusawa, S., Matsuo, T., Nakata, Y., Kamohara, S., Miyatake, N., Kotani, K., Komatsu, R., et al. (2011). Association of variations in the FTO, SCG3 and MTMR9 genes with metabolic syndrome in a Japanese population. *J Hum Genet*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21796137> [Accessed August 5, 2011].
- Hubina, E., Góth, M., and Korbonits, M. (2005). [Ghrelin--a hormone with multiple functions]. *Orv Hetil* 146, 1345–1351.
- Husted, S. M., Nielsen, M. O., Tygesen, M. P., Kiani, A., Blache, D., and Ingvarsen, K. L. (2007). Programming of intermediate metabolism in young lambs affected by late gestational maternal undernourishment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 293, E548–E557.
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., Gu, W., Kesterson, R. A., Boston, B. A., Cone, R. D., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131–141.

- I -

- Ikenasio-Thorpe, B. A., Breier, B. H., Vickers, M. H., and Fraser, M. (2007). Prenatal influences on susceptibility to diet-induced obesity are mediated by altered neuroendocrine gene expression. *J. Endocrinol.* 193, 31–37.
- Inui, A. (2000). Transgenic approach to the study of body weight regulation. *Pharmacol. Rev* 52, 35–61.
- Irani, B. G., Dunn-Meynell, A. A., and Levin, B. E. (2007). Altered hypothalamic leptin, insulin, and melanocortin binding associated with moderate-fat diet and predisposition to obesity. *Endocrinology* 148, 310–316.

Isganaitis, E., Jimenez-Chillaron, J., Woo, M., Chow, A., DeCoste, J., Vokes, M., Liu, M., Kasif, S., Zavacki, A.-M., Leshan, R. L., et al. (2009). Accelerated postnatal growth increases lipogenic gene expression and adipocyte size in low-birth weight mice. *Diabetes* 58, 1192–1200.

- J -

Jamali, A. K., and Tramu, G. (1997). Daily cycle of fos expression within hypothalamic POMC neurons of the male rat. *Brain Res.* 771, 45–54.

Jéquier, E. (2002). Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 967, 379–388.

Jirtle, R. L., and Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet* 8, 253–262.

Jo, Y.-H., Su, Y., Gutierrez-Juarez, R., and Chua, S., Jr (2009). Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *J. Neurophysiol.* 101, 2305–2316.

Jones, A. P., Assimon, S. A., and Friedman, M. I. (1986). The effect of diet on food intake and adiposity in rats made obese by gestational undernutrition. *Physiol. Behav.* 37, 381–386.

Joseph, V., Mamet, J., Lee, F., Dalmaz, Y., and Van Reeth, O. (2002). Prenatal hypoxia impairs circadian synchronisation and response of the biological clock to light in adult rats. *J. Physiol. (Lond.)* 543, 387–395.

Joss-Moore, L. A., Wang, Y., Campbell, M. S., Moore, B., Yu, X., Callaway, C. W., McKnight, R. A., Desai, M., Moyer-Mileur, L. J., and Lane, R. H. (2010). Uteroplacental insufficiency increases visceral adiposity and visceral adipose PPARgamma2 expression in male rat offspring prior to the onset of obesity. *Early Hum. Dev.* 86, 179–185.

- K -

Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26, 439–451.

Kadowaki, T., Yamauchi, T., and Kubota, N. (2008). The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett* 582, 74–80.

Kalra, S. P., and Kalra, P. S. (2004). NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy. *Neuropeptides* 38, 201–211.

- Kalra, S. P., Dube, M. G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T. L., and Kalra, P. S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev* 20, 68–100.
- Kalra, S. P., Dube, M. G., Sahu, A., Phelps, C. P., and Kalra, P. S. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88, 10931–10935.
- Kaneko, K., Yamada, T., Tsukita, S., Takahashi, K., Ishigaki, Y., Oka, Y., and Katagiri, H. (2009). Obesity alters circadian expressions of molecular clock genes in the brainstem. *Brain Res.* 1263, 58–68.
- Kaplan, N. M. (1989). The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch. Intern. Med* 149, 1514–1520.
- Kastin, A. J., and Pan, W. (2000). Dynamic regulation of leptin entry into brain by the blood-brain barrier. *Regul. Pept* 92, 37–43.
- Kaszubska, W., Falls, H. D., Schaefer, V. G., Haasch, D., Frost, L., Hessler, P., Kroeger, P. E., White, D. W., Jirousek, M. R., and Trevillyan, J. M. (2002). Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 195, 109–118.
- Kawamura, T., Egusa, G., Okubo, M., Imazu, M., and Yamakido, M. (1999). Association of beta3-adrenergic receptor gene polymorphism with insulin resistance in Japanese-American men. *Metab. Clin. Exp* 48, 1367–1370.
- Kawauchi, H., Kawazoe, I., Tsubokawa, M., Kishida, M., and Baker, B. I. (1983). Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature* 305, 321–323.
- Kershaw, E. E., Morton, N. M., Dhillon, H., Ramage, L., Seckl, J. R., and Flier, J. S. (2005). Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes* 54, 1023–1031.
- Khan, I. Y., Dekou, V., Douglas, G., Jensen, R., Hanson, M. A., Poston, L., and Taylor, P. D. (2005). A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 288, R127–R133.
- Kim, Y. B., Uotani, S., Pierroz, D. D., Flier, J. S., and Kahn, B. B. (2000). In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology* 141, 2328–2339.
- Kinzig, K. P., D'Alessio, D. A., and Seeley, R. J. (2002). The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness. *J. Neurosci* 22, 10470–10476.

- Kirk, S. L., Samuelsson, A.-M., Argenton, M., Dhonye, H., Kalamatianos, T., Poston, L., Taylor, P. D., and Coen, C. W. (2009). Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS ONE* 4, e5870.
- Kiss, A. C., Lima, P. H., Sinzato, Y. K., Takaku, M., Takeno, M. A., Rudge, M. V., and Damasceno, D. C. (2009). Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr* 1, 21.
- Kissileff, H. R., Pi-Sunyer, F. X., Thornton, J., and Smith, G. P. (1981). C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *Am. J. Clin. Nutr* 34, 154–160.
- Ko, C. H., and Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet. 15 Spec No 2*, R271–R277.
- Kohsaka, A., Laposky, A. D., Ramsey, K. M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Turek, F. W., and Bass, J. (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab.* 6, 414–421.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.
- Kokkotou, E., Jeon, J. Y., Wang, X., Marino, F. E., Carlson, M., Trombly, D. J., and Maratos-Flier, E. (2005). Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R117–R124.
- Van der Kooy, D., Koda, L. Y., McGinty, J. F., Gerfen, C. R., and Bloom, F. E. (1984). The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J. Comp. Neurol* 224, 1–24.
- Koutnikova, H., and Auwerx, J. (2001). Regulation of adipocyte differentiation. *Ann. Med* 33, 556–561.
- Krebs, D. L., and Hilton, D. J. (2000). SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 16), 2813–2819.
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., Clausen, J. T., Jensen, P. B., Madsen, O. D., Vrang, N., et al. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72–76.

- L -

- Lambert, P. D., Couceyro, P. R., McGirr, K. M., Dall Vechia, S. E., Smith, Y., and Kuhar, M. J. (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29, 293–298.

- Langley, S. C., and Jackson, A. A. (1994). Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin. Sci.* 86, 217–222; discussion 121.
- Langley-Evans, S. C. (1997). Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J. Hypertens.* 15, 537–544.
- Langley-Evans, S. C., Phillips, G. J., Benediktsson, R., Gardner, D. S., Edwards, C. R., Jackson, A. A., and Seckl, J. R. (1996). Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta* 17, 169–172.
- Larhammar, D. (1996). Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul. Pept* 65, 165–174.
- Lau, C. (1992). Effects of various stressors on milk release in the rat. *Physiol. Behav.* 51, 1157–1163.
- Laustsen, P. G., Michael, M. D., Crute, B. E., Cohen, S. E., Ueki, K., Kulkarni, R. N., Keller, S. R., Lienhard, G. E., and Kahn, C. R. (2002). Lipoatrophic diabetes in *Irs1(-)/Irs3(-)* double knockout mice. *Genes Dev* 16, 3213–3222.
- Lean, M. E., Han, T. S., and Morrison, C. E. (1995). Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ* 311, 158–161.
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I., and Friedman, J. M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632–635.
- Lee, K., Villena, J. A., Moon, Y. S., Kim, K.-H., Lee, S., Kang, C., and Sul, H. S. (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J Clin Invest* 111, 453–461.
- Leger, J., Noel, M., Limal, J. M., and Czernichow, P. (1996). Growth factors and intrauterine growth retardation. II. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF) I, and IGF-binding protein 3 levels in children with intrauterine growth retardation compared with normal control subjects: prospective study from birth to two years of age. Study Group of IUGR. *Pediatr. Res* 40, 101–107.
- Leibowitz, S. F. (1998). Differential functions of hypothalamic galanin cell groups in the regulation of eating and body weight. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 863, 206–220.
- Leibowitz, S. F. (1989). Hypothalamic neuropeptide Y, galanin, and amines. Concepts of coexistence in relation to feeding behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 575, 221–233; discussion 233–235.
- Leon, G. R., and Roth, L. (1977). Obesity: psychological causes, correlations, and speculations. *Psychol Bull* 84, 117–139.

- Léonhardt, M., Lesage, J., Croix, D., Dutriez-Casteloot, I., Beauvillain, J. C., and Dupouy, J. P. (2003). Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol. Reprod.* 68, 390–400.
- Lesage, J., Blondeau, B., Grino, M., Bréant, B., and Dupouy, J. P. (2001). Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 142, 1692–1702.
- Lesage, J., Del-Favero, F., Leonhardt, M., Louvart, H., Maccari, S., Vieau, D., and Darnaudey, M. (2004). Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J. Endocrinol* 181, 291–296.
- Lesage, J., Sebaai, N., Leonhardt, M., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Deloof, S., and Vieau, D. (2006). Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 9, 183–198.
- Levin, B. E., Dunn-Meynell, A. A., and Banks, W. A. (2004). Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R143–R150.
- Levitt, N. S., Lindsay, R. S., Holmes, M. C., and Seckl, J. R. (1996). Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* 64, 412–418.
- Lim, K., Armitage, J. A., Stefanidis, A., Oldfield, B. J., and Jane Black, M. (2011). IUGR in the Absence of Postnatal “Catch-Up” Growth Leads to Improved Whole Body Insulin Sensitivity in Rat Offspring. *Pediatr. Res.* 70, 339–344.
- Lin, H. C., and Chey, W. Y. (2003). Cholecystokinin and peptide YY are released by fat in either proximal or distal small intestine in dogs. *Regul. Pept* 114, 131–135.
- Lin, Y., Lee, H., Berg, A. H., Lisanti, M. P., Shapiro, L., and Scherer, P. E. (2000). The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J. Biol. Chem* 275, 24255–24263.
- Lisle, S. J. M., Lewis, R. M., Petry, C. J., Ozanne, S. E., Hales, C. N., and Forhead, A. J. (2003). Effect of maternal iron restriction during pregnancy on renal morphology in the adult rat offspring. *Br. J. Nutr* 90, 33–39.
- Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., Klein, A. S., Bulkley, G. B., Bao, C., Noble, P. W., et al. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* 12, 57–65.

- López, M., Seoane, L. M., Tovar, S., García, M. C., Nogueiras, R., Diéguez, C., and Señarís, R. M. (2005a). A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia* 48, 140–148.
- López, M., Tovar, S., Vázquez, M. J., Nogueiras, R., Señarís, R., and Diéguez, C. (2005b). Sensing the fat: fatty acid metabolism in the hypothalamus and the melanocortin system. *Peptides* 26, 1753–1758.
- Luan, J., Browne, P. O., Harding, A. H., Halsall, D. J., O’Rahilly, S., Chatterjee, V. K., and Wareham, N. J. (2001). Evidence for gene-nutrient interaction at the PPARgamma locus. *Diabetes* 50, 686–689.
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp* 156, 38–50; discussion 50–55.
- Ludwig, D. S., Tritos, N. A., Mastaitis, J. W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J. S., and Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest* 107, 379–386.
- Lumbers, E. R., Yu, Z. Y., and Gibson, K. J. (2001). The selfish brain and the barker hypothesis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28, 942–947.

- M -

- Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A. R., Cinque, C., and Van Reeth, O. (2003). Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 119–127.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., and Ranganathan, S. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med* 1, 1155–1161.
- Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járαι, Z., Fezza, F., Miura, G. I., Palmiter, R. D., Sugiura, T., et al. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822–825.
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., and Flier, J. S. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294, 2166–2170.
- Maumus, M., Peyrafitte, J.-A., D’Angelo, R., Fournier-Wirth, C., Bouloumié, A., Casteilla, L., Sengenès, C., and Bourin, P. (2011). Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes (Lond)*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266947> [Accessed July 17, 2011].

- McCance, R. A., and Widdowson, E. M. (1974). The determinants of growth and form. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 185, 1–17.
- McMillen, I. C., and Robinson, J. S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol. Rev* 85, 571–633.
- McNamara, P., Seo, S. B., Rudic, R. D., Sehgal, A., Chakravarti, D., and FitzGerald, G. A. (2001). Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell* 105, 877–889.
- Meister, B. (2000). Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam. Horm* 59, 265–304.
- Mendall, M. A., Patel, P., Asante, M., Ballam, L., Morris, J., Strachan, D. P., Camm, A. J., and Northfield, T. C. (1997). Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart* 78, 273–277.
- Mendoza, J., Pévet, P., and Challet, E. (2008). High-fat feeding alters the clock synchronization to light. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 5901–5910.
- Merali, Z., Moody, T. W., and Coy, D. (1993). Blockade of brain bombesin/GRP receptors increases food intake in satiated rats. *Am. J. Physiol* 264, R1031–R1034.
- Milagro, F. I., Campión, J., and Martínez, J. A. (2007). 11-Beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in white adipose tissue is strongly correlated with adiposity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 104, 81–84.
- Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., and Bouloumié, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110, 349–355.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S., Klein, S., and Coppack, S. W. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 4196–4200.
- Moog, F. (1979). Endocrine Influences on the Functional Differentiation of the Small Intestine. *Journal of Animal Science* 49, 239–249.
- Moran, T. H. (2000). Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 16, 858–865.
- Morris, T. J., Vickers, M., Gluckman, P., Gilmour, S., and Affara, N. (2009). Transcriptional profiling of rats subjected to gestational undernourishment: implications for the developmental variations in metabolic traits. *PLoS ONE* 4, e7271.
- Morrison, C. D., White, C. L., Wang, Z., Lee, S.-Y., Lawrence, D. S., Cefalu, W. T., Zhang, Z.-Y., and Gettys, T. W. (2007). Increased hypothalamic protein tyrosine phosphatase 1B contributes to leptin resistance with age. *Endocrinology* 148, 433–440.

- Mory, G., Bouillaud, F., Combes-George, M., and Ricquier, D. (1984). Noradrenaline controls the concentration of the uncoupling protein in brown adipose tissue. *FEBS Lett* 166, 393–396.
- Münzberg, H. (2008). Differential leptin access into the brain--a hierarchical organization of hypothalamic leptin target sites? *Physiol. Behav.* 94, 664–669.
- Münzberg, H., Björnholm, M., Bates, S. H., and Myers, M. G., Jr (2005). Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 642–652.
- Münzberg, H., Flier, J. S., and Bjørbaek, C. (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145, 4880–4889.
- Murphy, K. G. (2005). Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4, 95–111.
- Mynatt, R. L., Miltenberger, R. J., Klebig, M. L., Zemel, M. B., Wilkinson, J. E., Wilkinson, W. O., and Woychik, R. P. (1997). Combined effects of insulin treatment and adipose tissue-specific agouti expression on the development of obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 919–922.

- N -

- Naef, L., Srivastava, L., Gratton, A., Hendrickson, H., Owens, S. M., and Walker, C.-D. (2008). Maternal high fat diet during the perinatal period alters mesocorticolimbic dopamine in the adult rat offspring: reduction in the behavioral responses to repeated amphetamine administration. *Psychopharmacology (Berl.)* 197, 83–94.
- Nagai, K., Nishio, T., Nakagawa, H., Nakamura, S., and Fukuda, Y. (1978). Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food-intake. *Brain Res* 142, 384–389.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194–198.
- Neary, N. M., Goldstone, A. P., and Bloom, S. R. (2004). Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 60, 153–160.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 293, E444–E452.
- Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *Am. J. Hum. Genet* 14, 353–362.
- Nivoit, P., Morens, C., Van Assche, F. A., Jansen, E., Poston, L., Remacle, C., and Reusens, B. (2009). Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia* 52, 1133–1142.

- Nowak, K. W., Strowski, M. Z., Switonska, M. M., Kaczmarek, P., Singh, V., Fabis, M., Mackowiak, P., Nowak, M., and Malendowicz, L. K. (2005). Evidence that orexins A and B stimulate insulin secretion from rat pancreatic islets via both receptor subtypes. *Int. J. Mol. Med* 15, 969–972.
- Nyirenda, M. J., Lindsay, R. S., Kenyon, C. J., Burchell, A., and Seckl, J. R. (1998). Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J. Clin. Invest* 101, 2174–2181.
- O -
- O'Regan, D., Welberg, L. L., Holmes, M. C., and Seckl, J. R. (2001). Glucocorticoid programming of pituitary-adrenal function: mechanisms and physiological consequences. *Semin Neonatol* 6, 319–329.
- Obici, S., Feng, Z., Karkanas, G., Baskin, D. G., and Rossetti, L. (2002a). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat. Neurosci* 5, 566–572.
- Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanas, G., and Rossetti, L. (2002b). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51, 271–275.
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A. W., et al. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120.
- Ohta, H., Xu, S., Moriya, T., Iigo, M., Watanabe, T., Nakahata, N., Chisaka, H., Hanita, T., Matsuda, T., Ohura, T., et al. (2008). Maternal feeding controls fetal biological clock. *PLoS ONE* 3, e2601.
- Ortega, F. J., Mayas, D., Moreno-Navarrete, J. M., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Esteve, E., Rodriguez-Hermosa, J. I., Ruiz, B., Ricart, W., Peral, B., et al. (2010). The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)* 18, 13–20.
- Oscai, L. B., and McGarr, J. A. (1978). Evidence that the amount of food consumed in early life fixes appetite in the rat. *Am. J. Physiol.* 235, R141–R144.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol* 11, 85–97.
- Ozanne, S. E., Dorling, M. W., Wang, C. L., and Nave, B. T. (2001). Impaired PI 3-kinase activation in adipocytes from early growth-restricted male rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E534–E539.

Ozanne, S. E., Lewis, R., Jennings, B. J., and Hales, C. N. (2004). Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. *Clinical Science* 106, 141.

- P -

Parnet, P., Bolaños-Jimenez, F., and Amarger, V. (2007). Syndrome métabolique : une histoire d’empreinte nutritionnelle et d’épigénétique ? *Obésité* 2, 158–165.

Patel, M. S., Vadlamudi, S., and Johanning, G. L. (1994). Artificial rearing of rat pups: implications for nutrition research. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 21–40.

Pedrazzini, T. (2004). Importance of NPY Y1 receptor-mediated pathways: assessment using NPY Y1 receptor knockouts. *Neuropeptides* 38, 267–275.

Pedrazzini, T., Seydoux, J., Künstner, P., Aubert, J. F., Grouzmann, E., Beermann, F., and Brunner, H. R. (1998). Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat. Med* 4, 722–726.

Pérez, C., Fernández-Galaz, C., Fernández-Agulló, T., Arribas, C., Andrés, A., Ros, M., and Carrascosa, J. M. (2004). Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53, 347–353.

Phillips, D. I., Barker, D. J., Fall, C. H., Seckl, J. R., Whorwood, C. B., Wood, P. J., and Walker, B. R. (1998). Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 757–760.

Pinto, S., Roseberry, A. G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J. M., and Horvath, T. L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304, 110–115.

Pittner, R. A., Moore, C. X., Bhavsar, S. P., Gedulin, B. R., Smith, P. A., Jodka, C. M., Parkes, D. G., Paterniti, J. R., Srivastava, V. P., and Young, A. A. (2004). Effects of PYY[3-36] in rodent models of diabetes and obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* 28, 963–971.

Plagemann, A. (2006). Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm. Res.* 65 *Suppl* 3, 83–89.

Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Roepke, K., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K., et al. (2009). Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 4963–4976.

- Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rohde, W., and Dörner, G. (2000a). Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J. Nutr.* *130*, 2582–2589.
- Plagemann, A., Heidrich, I., Götz, F., Rohde, W., and Dörner, G. (1992). Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp. Clin. Endocrinol* *99*, 154–158.
- Plagemann, A., Waas, T., Harder, T., Rittel, F., Ziska, T., and Rohde, W. (2000b). Hypothalamic neuropeptide Y levels in weaning offspring of low-protein malnourished mother rats. *Neuropeptides* *34*, 1–6.
- Plum, L., Ma, X., Hampel, B., Balthasar, N., Coppari, R., Münzberg, H., Shanabrough, M., Burdakov, D., Rother, E., Janoschek, R., et al. (2006). Enhanced PIP3 signaling in POMC neurons causes KATP channel activation and leads to diet-sensitive obesity. *J. Clin. Invest.* *116*, 1886–1901.
- Polonsky, K. S., Given, B. D., and Van Cauter, E. (1988). Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J. Clin. Invest* *81*, 442–448.
- Pritchard, L. E., Turnbull, A. V., and White, A. (2002). Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J. Endocrinol* *172*, 411–421.
- Proulx, K., Richard, D., and Walker, C.-D. (2002). Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology* *143*, 4683–4692.

- Q -

- Qiu, J. (2006). Epigenetics: Unfinished symphony. *Nature* *441*, 143–145.

- R -

- Rahmouni, K., Morgan, D. A., Morgan, G. M., Mark, A. L., and Haynes, W. G. (2005). Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes* *54*, 2012–2018.
- Rajakumar, P. A., He, J., Simmons, R. A., and Devaskar, S. U. (1998). Effect of uteroplacental insufficiency upon brain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression and concentrations. *Pediatr. Res.* *44*, 168–174.
- Rampal, P. (1986). [Mechanisms of the control of appetite]. *Presse Med* *15*, 23–25.

- Razny, U., Kiec-Wilk, B., Polus, A., Wator, L., Dyduch, G., Partyka, L., Bodzioch, M., Tomaszewska, R., and Wybranska, I. (2010). The adipose tissue gene expression in mice with different nitric oxide availability. *J. Physiol. Pharmacol* 61, 607–618.
- Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595–1607.
- Remmers, F., Verhagen, L. A. W., Adan, R. A. H., and Delemarre-van de Waal, H. A. (2008). Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. *Endocrinology* 149, 3617–3625.
- Rich, S. S., Bowden, D. W., Haffner, S. M., Norris, J. M., Saad, M. F., Mitchell, B. D., Rotter, J. I., Langefeld, C. D., Wagenknecht, L. E., and Bergman, R. N. (2004). Identification of quantitative trait loci for glucose homeostasis: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Family Study. *Diabetes* 53, 1866–1875.
- Richard, D., Lin, Q., and Timofeeva, E. (2002). The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *Eur. J. Pharmacol* 440, 189–197.
- Ridker, P. M. (2003). Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 107, 363–369.
- Rivière, G., Michaud, A., Breton, C., VanCamp, G., Laborie, C., Enache, M., Lesage, J., Deloof, S., Corvol, P., and Vieau, D. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension* 46, 1169–1174.
- Rodbell, M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem* 239, 375–380.
- Rodgers, R. J., Ishii, Y., Halford, J. C. G., and Blundell, J. E. (2002). Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 36, 303–325.
- Rodrigues, A. L., de Moura, E. G., Passos, M. C. F., Trevenzoli, I. H., da Conceição, E. P. S., Bonono, I. T., Neto, J. F. N., and Lisboa, P. C. (2011). Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J. Nutr. Biochem.* 22, 109–117.
- Ron, D., Brasier, A. R., McGehee, R. E., Jr, and Habener, J. F. (1992). Tumor necrosis factor-induced reversal of adipocytic phenotype of 3T3-L1 cells is preceded by a loss of nuclear CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). *J. Clin. Invest* 89, 223–233.
- Rosen, E. D. (2005). The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 73, 31–34.
- Rosenberg, A. (2008). The IUGR newborn. *Semin. Perinatol* 32, 219–224.

Rossi, M., Kim, M. S., Morgan, D. G., Small, C. J., Edwards, C. M., Sunter, D., Abusnana, S., Goldstone, A. P., Russell, S. H., Stanley, S. A., et al. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139, 4428–4431.

- S -

Saad, M. F., Riad-Gabriel, M. G., Khan, A., Sharma, A., Michael, R., Jinagouda, S. D., Boyadjian, R., and Steil, G. M. (1998). Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 453–459.

Sakurai, T. (2005). Roles of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med Rev* 9, 231–241.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573–585.

Samuelsson, A.-M., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H. J. M., Piersma, A. H., Ozanne, S. E., Twinn, D. F., Rémacle, C., et al. (2008). Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 51, 383–392.

Sánchez-Corona, J., Flores-Martínez, S. E., Machorro-Lazo, M. V., Galaviz-Hernández, C., Morán-Moguel, M. C., Perea, F. J., Mújica-López, K. I., Vargas-Ancona, L., Laviada-Molina, H. A., Fernández, V., et al. (2004). Polymorphisms in candidate genes for type 2 diabetes mellitus in a Mexican population with metabolic syndrome findings. *Diabetes Res. Clin. Pract* 63, 47–55.

Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Tsuji, T., Masuzaki, H., Hiraoka, J., Okazaki, T., Tamaki, M., Hayase, M., Yoshimasa, Y., et al. (1997). Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology* 138, 947–954.

Sawchenko, P. E., Swanson, L. W., Grzanna, R., Howe, P. R., Bloom, S. R., and Polak, J. M. (1985). Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol* 241, 138–153.

Schibler, U., Ripperger, J., and Brown, S. A. (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J. Biol. Rhythms* 18, 250–260.

Schwartz, M. W., Dallman, M. F., and Woods, S. C. (1995). Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *Am. J. Physiol* 269, R949–R957.

- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P., and Baskin, D. G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* *46*, 2119–2123.
- Schwartz, M. W., Sipols, A. J., Marks, J. L., Sanacora, G., White, J. D., Scheurink, A., Kahn, S. E., Baskin, D. G., Woods, S. C., and Figlewicz, D. P. (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* *130*, 3608–3616.
- Sebaai, N., Lesage, J., Breton, C., Vieau, D., and Deloof, S. (2004). Perinatal food deprivation induces marked alterations of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in 8-month-old male rats both under basal conditions and after a dehydration period. *Neuroendocrinology* *79*, 163–173.
- Seckl, J. R. (2001). Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol. Cell. Endocrinol* *185*, 61–71.
- Segal-Lieberman, G., Rubinfeld, H., Glick, M., Kronfeld-Schor, N., and Shimon, I. (2006). Melanin-concentrating hormone stimulates human growth hormone secretion: a novel effect of MCH on the hypothalamic-pituitary axis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* *290*, E982–E988.
- Sengenès, C., Miranville, A., Maumus, M., de Barros, S., Busse, R., and Bouloumié, A. (2007). Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31-progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem Cells* *25*, 2269–2276.
- Shen, W., Wang, Z., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., Imielinska, C., Ross, R., and Heymsfield, S. B. (2003). Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes. Res* *11*, 5–16.
- Shepherd, P. R., Crowther, N. J., Desai, M., Hales, C. N., and Ozanne, S. E. (1997). Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br. J. Nutr* *78*, 121–129.
- Shi, X. M., Blair, H. C., Yang, X., McDonald, J. M., and Cao, X. (2000). Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPAR γ 2 gene transcription in glucocorticoid-induced adipocyte differentiation. *J. Cell. Biochem* *76*, 518–527.
- Shimada, M., Tritos, N. A., Lowell, B. B., Flier, J. S., and Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* *396*, 670–674.
- Shimba, S., Ishii, N., Ohta, Y., Ohno, T., Watabe, Y., Hayashi, M., Wada, T., Aoyagi, T., and Tezuka, M. (2005). Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 12071–12076.

- Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., Hayashi, T., Inoue, G., Hosoda, K., Kojima, M., et al. (2001). Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50, 227–232.
- Simmons, R. A., Templeton, L. J., and Gertz, S. J. (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 50, 2279–2286.
- Singru, P. S., Sánchez, E., Fekete, C., and Lechan, R. M. (2007). Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety. *Endocrinology* 148, 638–646.
- Sinha, M. K., and Caro, J. F. (1998). Clinical aspects of leptin. *Vitam. Horm* 54, 1–30.
- Small, C. J., Kim, M. S., Stanley, S. A., Mitchell, J. R., Murphy, K., Morgan, D. G., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (2001). Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 50, 248–254.
- Smas, C. M., and Sul, H. S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725–734.
- Smas, C. M., Chen, L., Zhao, L., Latasa, M. J., and Sul, H. S. (1999). Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem* 274, 12632–12641.
- Smith, B. K., York, D. A., and Bray, G. A. (1994). Chronic cerebroventricular galanin does not induce sustained hyperphagia or obesity. *Peptides* 15, 1267–1272.
- Smith, J. T., and Waddell, B. J. (2002). Leptin receptor expression in the rat placenta: changes in ob-ra, ob-rb, and ob-re with gestational age and suppression by glucocorticoids. *Biol. Reprod.* 67, 1204–1210.
- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 253–278.
- Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B., and Hoet, J. J. (1990). Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol. Neonate* 57, 107–118.
- Son, G. H., Chung, S., and Kim, K. (2011). The adrenal peripheral clock: Glucocorticoid and the circadian timing system. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802440> [Accessed September 22, 2011].
- Srinivasan, M., Katewa, S. D., Palaniyappan, A., Pandya, J. D., and Patel, M. S. (2006). Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 291, E792–E799.

- Srinivasan, M., Mitrani, P., Sadhanandan, G., Dodds, C., Shbeir-ElDika, S., Thamotharan, S., Ghanim, H., Dandona, P., Devaskar, S. U., and Patel, M. S. (2008). A high-carbohydrate diet in the immediate postnatal life of rats induces adaptations predisposing to adult-onset obesity. *J. Endocrinol.* *197*, 565–574.
- Stanley, B. G., Kyrkouli, S. E., Lampert, S., and Leibowitz, S. F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* *7*, 1189–1192.
- Stephens, D. N. (1980). Growth and the development of dietary obesity in adulthood of rats which have been undernourished during development. *Br. J. Nutr.* *44*, 215–227.
- Steppan, C. M., and Swick, A. G. (1999). A role for leptin in brain development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *256*, 600–602.
- Stevens, A., Begum, G., and White, A. (2011). Epigenetic changes in the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene: a mechanism linking maternal undernutrition to obesity in the offspring? *Eur. J. Pharmacol.* *660*, 194–201.
- Stocker, C., O'Dowd, J., Morton, N. M., Wargent, E., Sennitt, M. V., Hislop, D., Glund, S., Seckl, J. R., Arch, J. R. S., and Cawthorne, M. A. (2004). Modulation of susceptibility to weight gain and insulin resistance in low birthweight rats by treatment of their mothers with leptin during pregnancy and lactation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *28*, 129–136.
- Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H.-J., and Scherbaum, W. A. (2004). Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiol. Behav* *83*, 47–54.
- Straus, D. S., Ooi, G. T., Orlowski, C. C., and Rechler, M. M. (1991). Expression of the genes for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins-1 and -2 in fetal rat under conditions of intrauterine growth retardation caused by maternal fasting. *Endocrinology* *128*, 518–525.
- Sugden, M. C., Langdown, M. L., Munns, M. J., and Holness, M. J. (2001). Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *Eur. J. Endocrinol.* *145*, 529–539.
- Sulewska, A., Niklinska, W., Kozlowski, M., Minarowski, L., Naumnik, W., Niklinski, J., Dabrowska, K., and Chyczewski, L. (2007). DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem. Cytobiol* *45*, 149–158.
- Suter, M., Bocock, P., Showalter, L., Hu, M., Shope, C., McKnight, R., Grove, K., Lane, R., and Aagaard-Tillery, K. (2011). Epigenomics: maternal high-fat diet exposure in utero disrupts peripheral circadian gene expression in nonhuman primates. *FASEB J.* *25*, 714–726.

Suzuki, T., Kohno, H., Sakurada, T., Tadano, T., and Kisara, K. (1982). Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav* 17, 249–253.

- T -

Tamashiro, K. L. K., Terrillion, C. E., Hyun, J., Koenig, J. I., and Moran, T. H. (2009). Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58, 1116–1125.

Tang-Christensen, M., Vrang, N., and Larsen, P. J. (2001). Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* 25 *Suppl* 5, S42–S47.

Tartaglia, L. A. (1997). The leptin receptor. *J. Biol. Chem* 272, 6093–6096.

Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263–1271.

Tecott, L. H., Sun, L. M., Akana, S. F., Strack, A. M., Lowenstein, D. H., Dallman, M. F., and Julius, D. (1995). Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. *Nature* 374, 542–546.

Thoman, E. B., and Levine, S. (1970). Hormonal and behavioral changes in the rat mother as a function of early experience treatments of the offspring. *Physiol. Behav* 5, 1417–1421.

Tian, D.-R., Li, X.-D., Shi, Y.-S., Wan, Y., Wang, X.-M., Chang, J.-K., Yang, J., and Han, J.-S. (2004). Changes of hypothalamic alpha-MSH and CART peptide expression in diet-induced obese rats. *Peptides* 25, 2147–2153.

Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B. M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156.

Trotta, P. A., Moura, E. G., Franco, J. G., Lima, N. S., de Oliveira, E., Cordeiro, A., Souza, L. L., Oliveira, K. J., Lisboa, P. C., Pazos Moura, C. C., et al. (2011). Blocking leptin action one week after weaning reverts most of the programming caused by neonatal hyperleptinemia in the adult rat. *Horm. Metab. Res.* 43, 171–177.

Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., et al. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308, 1043–1045.

Turnbull, A. V., and Rivier, C. (1997). Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 215, 1–10.

- U -

Unger, J., McNeill, T. H., Moxley, R. T., 3rd, White, M., Moss, A., and Livingston, J. N. (1989). Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience* 31, 143–157.

- V -

Varma, A., He, J., Weissfeld, L., and Devaskar, S. U. (2003). Postnatal intracerebroventricular exposure to neuropeptide Y causes weight loss in female adult rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R1560–R1566.

Verhaeghe, J., Van Bree, R., Van Herck, E., Laureys, J., Bouillon, R., and Van Assche, F. A. (1993). C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum: correlations with birth weight. *Am. J. Obstet. Gynecol* 169, 89–97.

Vickers, M. H., Breier, B. H., Cutfield, W. S., Hofman, P. L., and Gluckman, P. D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 279, E83–E87.

Vickers, M. H., Breier, B. H., McCarthy, D., and Gluckman, P. D. (2003). Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R271–R273.

Vickers, M. H., Gluckman, P. D., Coveny, A. H., Hofman, P. L., Cutfield, W. S., Gertler, A., Breier, B. H., and Harris, M. (2005). Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 146, 4211–4216.

Vickers, M. H., Gluckman, P. D., Coveny, A. H., Hofman, P. L., Cutfield, W. S., Gertler, A., Breier, B. H., and Harris, M. (2008). The Effect of Neonatal Leptin Treatment on Postnatal Weight Gain in Male Rats Is Dependent on Maternal Nutritional Status during Pregnancy. *Endocrinology* 149, 1906–1913.

Vickers, M. H., Reddy, S., Ikenasio, B. A., and Breier, B. H. (2001). Dysregulation of the adipoinular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J. Endocrinol.* 170, 323–332.

Vickers, S. P., and Kennett, G. A. (2005). Cannabinoids and the regulation of ingestive behaviour. *Curr Drug Targets* 6, 215–223.

Vieau, D. (2009). La dénutrition maternelle périnatale programme les systèmes neuroendocriniens impliqués dans la réponse au stress chez le rat mâle adulte : rôle dans la genèse du syndrome métabolique? *Médecine et Nutrition* 45, 6.

Vieau, D., Sebaai, N., Léonhardt, M., Dutriez-Casteloot, I., Molendi-Coste, O., Laborie, C., Breton, C., Deloof, S., and Lesage, J. (2007). HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology* 32 Suppl 1, S16–S20.

Vuguin, P. M. (2007). Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm. Res.* 68, 113–123.

- W -

Wada, E., Way, J., Shapira, H., Kusano, K., Lebacqz-Verheyden, A. M., Coy, D., Jensen, R., and Battery, J. (1991). cDNA cloning, characterization, and brain region-specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron* 6, 421–430.

Wadsworth, M. E., Cripps, H. A., Midwinter, R. E., and Colley, J. R. (1985). 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)* 291, 1534–1538.

Walker, C.-D., Naef, L., d' Asti, E., Long, H., Xu, Z., Moreau, A., and Azeddine, B. (2008). Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1144, 189–202.

Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N., and Rossetti, L. (1998). A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393, 684–688.

Waterland, R. A. (2009). Early environmental effects on epigenetic regulation in humans. *Epigenetics* 4, 523–525.

Waterland, R. A., and Garza, C. (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr* 69, 179–197.

Waterland, R. A., and Jirtle, R. L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol. Cell. Biol* 23, 5293–5300.

Waterland, R. A., Dolinoy, D. C., Lin, J.-R., Smith, C. A., Shi, X., and Tahiliani, K. G. (2006). Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis* 44, 401–406.

Waterland, R. A., Travisano, M., and Tahiliani, K. G. (2007). Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female. *FASEB J* 21, 3380–3385.

Weiland, T. J., Voudouris, N. J., and Kent, S. (2004). The role of CCK2 receptors in energy homeostasis: insights from the CCK2 receptor-deficient mouse. *Physiol. Behav* 82, 471–476.

Weinstock, M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 1073–1086.

- Wenger, T., and Moldrich, G. (2002). The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 301–307.
- Whitaker, K. W., Totoki, K., and Reyes, T. M. (2011). Metabolic adaptations to early life protein restriction differ by offspring sex and post-weaning diet in the mouse. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475311000548> [Accessed September 13, 2011].
- Widdowson, E. M., and McCance, R. A. (1963). The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* 158, 329–342.
- Wigglesworth, J. S. (1974). Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. *Am. J. Pathol* 77, 347–350.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047–1053.
- Wilding, J. P. H. (2002). Neuropeptides and appetite control. *Diabet. Med* 19, 619–627.
- Williams, G., Bing, C., Cai, X. J., Harrold, J. A., King, P. J., and Liu, X. H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol. Behav* 74, 683–701.
- Williams, G., Harrold, J. A., and Cutler, D. J. (2000). The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc* 59, 385–396.
- Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., and Yanagisawa, M. (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu. Rev. Neurosci* 24, 429–458.
- Wilson, B. D., Bagnol, D., Kaelin, C. B., Ollmann, M. M., Gantz, I., Watson, S. J., and Barsh, G. S. (1999a). Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* 140, 2387–2397.
- Wilson, B. D., Ollmann, M. M., and Barsh, G. S. (1999b). The role of agouti-related protein in regulating body weight. *Mol Med Today* 5, 250–256.
- Winick, M., and Noble, A. (1966). Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr* 89, 300–306.
- Wolff, G. L., Kodell, R. L., Moore, S. R., and Cooney, C. A. (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J* 12, 949–957.
- Woods, S. C., and D'Alessio, D. A. (2008). Central control of body weight and appetite. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 93, S37–S50.

- Woods, S. C., Decker, E., and Vasselli, J. R. (1974). Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev* 81, 26–43.
- Woods, S. C., Lotter, E. C., McKay, L. D., and Porte, D., Jr (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282, 503–505.
- Wu, X., Motoshima, H., Mahadev, K., Stalker, T. J., Scalia, R., and Goldstein, B. J. (2003). Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52, 1355–1363.

- Y -

- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762–769.
- Yang, Y. K., Thompson, D. A., Dickinson, C. J., Wilken, J., Barsh, G. S., Kent, S. B., and Gantz, I. (1999). Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors. *Mol. Endocrinol* 13, 148–155.
- Yoshihara, T., Honma, S., and Honma, K. (1996). Effects of restricted daily feeding on neuropeptide Y release in the rat paraventricular nucleus. *Am. J. Physiol* 270, E589–E595.
- Yu, I.-C., Lin, H.-Y., Liu, N.-C., Wang, R.-S., Sparks, J. D., Yeh, S., and Chang, C. (2008). Hyperleptinemia without obesity in male mice lacking androgen receptor in adipose tissue. *Endocrinology* 149, 2361–2368.
- Yudkin, J. S., Kumari, M., Humphries, S. E., and Mohamed-Ali, V. (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148, 209–214.
- Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., Kawamura, M., Takemura, M., Kakui, K., Ogawa, Y., et al. (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab.* 1, 371–378.

- Z -

- Zhang, T., Guan, H., Arany, E., Hill, D. J., and Yang, K. (2007). Maternal protein restriction permanently programs adipocyte growth and development in adult male rat offspring. *J. Cell. Biochem.* 101, 381–388.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.

- Zhou, A., Bloomquist, B. T., and Mains, R. E. (1993). The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing. *J. Biol. Chem* 268, 1763–1769.
- Zvonic, S., Ptitsyn, A. A., Conrad, S. A., Scott, L. K., Floyd, Z. E., Kilroy, G., Wu, X., Goh, B. C., Mynatt, R. L., and Gimble, J. M. (2006). Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes* 55, 962–970.

Effets d'une dénutrition maternelle prénatale sur la régulation de l'homéostasie énergétique chez la descendance mâle adulte : focus sur l'hypothalamus et le tissu adipeux

Des données épidémiologiques indiquent qu'une dénutrition maternelle périnatale (DMP) conduit à un retard de croissance intra-utérin caractérisé par un petit poids de naissance et prédispose la descendance au développement d'un syndrome métabolique à l'âge adulte. Afin de comprendre les mécanismes potentiellement impliqués dans la mise en place de ce syndrome, nous avons développé un modèle de programmation foetale chez le rat par restriction alimentaire de 70% pendant toute la durée de la gestation : le modèle FR30.

Nos travaux ont montré que la DMP contribue à une sensibilité accrue de la descendance mâle au développement de traits du syndrome métabolique. Les rats mâles adultes FR30 présentent une hypertension artérielle modérée, une hyperleptinémie sans phénotype d'obésité, une hypercorticostéronémie, une perturbation de la régulation de la glycémie ainsi qu'une hyperphagie associée à un décalage de la prise de nourriture en phase diurne suggérant une perturbation des rythmes biologiques. Les rats FR30 présentent également des altérations subtiles des projections des neurones hypothalamiques à POMC. L'absence de variation du niveau d'expression de gènes hypothalamiques cibles de la leptine (en particulier NPY et POMC), associée à la diminution de l'expression hypothalamique de son récepteur, laissent supposer un état de résistance à la leptine.

Notre objectif a été ensuite d'identifier les mécanismes tissulaires programmés par la DMP chez la descendance mâle FR30 adulte dans l'hypothalamus et deux dépôts de tissu adipeux blanc. Basé sur la théorie de la programmation foetale, nous avons tenté d'exacerber les perturbations métaboliques observées et/ou silencieuses sous régime standard en plaçant les rats FR30 sous un régime alimentaire hyperlipidique (HF) dès le sevrage.

Bien que la DMP n'exacerbe pas les traits de syndrome métaboliques induits par le régime HF chez la descendance, les rats adultes FR30HF présentent une prise de poids plus importante malgré une absence d'hyperphagie, une masse des dépôts de tissu adipeux rapportée au poids corporel augmentée, un taux de leptine plasmatique plus important et une absence d'augmentation du taux de glucocorticoïdes circulants. Nous avons montré que le tissu adipeux présente de fortes variations d'expression génique, contrairement à l'hypothalamus qui semble préserver des perturbations géniques. En effet, les taux d'ARNm de la leptine et de son récepteur, de précurseurs de peptides et de leurs récepteurs, de facteurs impliqués dans la lipogenèse et dans la sensibilité aux glucocorticoïdes, ainsi que les mécanismes impliqués dans la sensibilité à la leptine, sont modulés de manière différente en fonction des dépôts chez les rats FR30HF.

Nos travaux suggèrent donc que l'axe hypothalamo-adipocytaire constitue l'une des cibles privilégiées de la programmation foetale suite à une DMP chez la descendance mâle adulte.

Effects of maternal prenatal undernutrition on the energy metabolism regulation of adult male offspring: focus on hypothalamus and adipose tissue

Epidemiological studies have shown that maternal undernutrition during pregnancy (MU) leads to intrauterine growth retardation and low birth weight, and may predispose individuals to the development of metabolic syndrome later in life. In order to better understand the underlying mechanisms, we have developed a model of prenatal maternal 70% food-restricted diet throughout gestation in pregnant female rats called FR30.

Our results show that MU contributes to the appearance of some metabolic syndrome features in adult male rat offspring. FR30 rats show mild hypertension, hyperleptinemia without obesity, hypercorticosteronemia, impaired glucose intolerance and hyperphagia associated with dysregulated light/dark-phase food intake rhythm. FR30 rats also exhibit subtle alterations of POMC hypothalamic neurons projections. The absence of hypothalamic leptin target genes expression variation (especially POMC and NPY), associated with the decrease of its receptor hypothalamic expression, suggest a leptin-resistant state.

Our goal was then to identify tissue mechanisms programmed by MU in FR30 adult male offspring hypothalamus and two white adipose tissue (WAT) deposits. Based on the developmental origins of the metabolic syndrome, we attempted to heighten visible and/or silent metabolic alterations observed under standard diet by feeding FR30 rats a high fat (HF) diet since the weaning.

Although MU does not worsen the metabolic syndrome features induced by postnatal HF feeding, FR30 adult rats gain more weight whereas they are not hyperphagic. When expressed relative to body weight, FR30HF rats exhibit greater body fat content, a rise of serum leptin levels and a blunted increase of corticosterone levels. FR30 MU does not significantly affect the hypothalamic mRNA levels whereas it leads to marked gene expression variation in WAT. Indeed, leptin and Ob-Rb, peptides precursors and their receptors and some factors involved in lipogenesis and glucocorticoid sensitivity mRNA expression levels as well as mechanisms involved in leptin sensitivity, were modified in FR30 offspring in depot-specific and diet-specific manners.

Our results suggest that the hypothalamus-white adipose tissue axis is one of the key targets of MU fetal programming in adult male rat offspring.