

# Université de Lille Nord de France

Ecole doctorale « Biologie Santé »

De Lille Nord de France

## **Conséquences transgénérationnelles d'une programmation fœtale par dénutrition maternelle et d'un régime hyperlipidique chez le rat: focus sur le placenta**

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Physiologie

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Ouma CISSE**

*Le 04 avril 2013 devant le jury ci-dessous*

<b>Président</b>	Pr Lefebvre Tony, Université Lille Nord de France
<b>Rapporteurs</b>	Dr Abdennebi-Najar Latifa, Institut Polytechnique La Salle de Beauvais Pr Sapin Vincent, Biochimie et Biologie Moléculaire - Faculté de Médecine Université d'Auvergne Clermont-Ferrand
<b>Examineur</b>	Pr Reusens Brigitte, Laboratoire Biologie Cellulaire, Université Catholique de Louvain
<b>Directrice</b>	Dr Fajardy Isabelle, Centre de biologie pathologie, CHRU de Lille
<b>Co-directrice</b>	Dr Laborie Christine, Université Lille Nord de France

*A mes parents, à mes sœurs*

## **Conséquences transgénérationnelles d'une programmation fœtale par dénutrition maternelle et d'un régime hyperlipidique chez le rat : focus sur le placenta**

Le concept de DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) qui découle de la théorie de Barker, replace l'origine des maladies métaboliques de l'adulte au moment du développement fœtal et/ou périnatal. De nombreuses données épidémiologiques indiquent qu'une dysnutrition maternelle (dénutrition, surnutrition) a des répercussions sur la croissance fœtale qui se traduisent par une anomalie du poids à la naissance (retard de croissance intra utérin : RCIU / gros poids de naissance : Macrosomie) et prédisposent l'individu au développement des maladies métaboliques. Afin de mieux comprendre les mécanismes susceptibles de transmettre de génération en génération cette vulnérabilité métabolique, nous avons développé un modèle transgénérationnel chez le rat associant la programmation fœtale chez la F0 par dénutrition maternelle (modèle FR30) et une dysnutrition chez la F1 avec un régime alimentaire hyperlipidique.

Nos résultats montrent qu'une restriction alimentaire de 70% durant toute la grossesse (modèle FR30) contribue à une sensibilité accrue chez la descendance F1 femelle au développement de traits de syndrome métabolique. Les femelles F1 issues de mères dénutries présentent à l'âge adulte une intolérance au glucose et une hyperleptinémie. Les femelles de la F1 soumises à un régime hyperlipidique « high fat » (HF) ne présentent pas d'obésité que ce soit celles issues de mères contrôles que de mères dénutries. La faible appétence du régime, et la carence en hydrates de carbone qui l'accompagnent ne permettent pas le développement de l'obésité. En revanche, ce régime accentue les perturbations métaboliques chez des animaux sensibilisés par la programmation.

Lorsque les femelles F1 sont mises en reproduction, on observe qu'en réponse à la programmation fœtale (FR) et/ou au régime alimentaire (Standard ou HF) la trajectoire de croissance dans la descendance F2 conduit à des phénotypes différents à la naissance. Les nouveau-nés de mères F1 issues de mères C ou FR et ayant suivi un régime HF en pré-gestation et en gestation (C HF-HF et FR HF-HF) ont un RCIU. A l'inverse, les nouveau-nés issus de mères F1 issues de mères dénutries et ayant eu un régime HF en pré-gestation puis un régime standard durant la gestation (FR HF-S) ont une macrosomie. Les perturbations métaboliques et hormonales des mères F1 ne pouvant expliquer à elles seules la survenue de ces phénotypes, nous nous sommes intéressés à l'organe situé à l'interface entre les compartiments maternels et fœtaux permettant le dialogue entre la mère et le fœtus : le placenta.

L'analyse morphologique et moléculaire du placenta nous indique que cet organe est non seulement sensible aux modifications métaboliques de la mère, mais s'adapte à la demande du fœtus. On observe de fortes variations géniques qui se traduisent par une surexpression ou sous expressions géniques selon le phénotype observé RCIU ou macrosomie. Il est important de noter que les variations présentent un dimorphisme sexuel.

Nos travaux suggèrent donc que les phénotypes de RCIU ou macrosomie sont le résultat d'anomalies métaboliques et hormonales maternelles mais également de l'adaptation génique placentaire sexe-spécifique.

# Remerciements

## Aux membres du jury

Je remercie le Pr Tony Lefevbre de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance de thèse.

Je remercie sincèrement le Pr Vincent Sapin et le Dr Latifa Abdennebi-Najar d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Pr Brigitte Reusens d'avoir accepté d'être l'examineur de cette thèse.

## Aux Drs Christine Laborie et Isabelle Fajardy

Ma chère Christine, je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour ton encadrement depuis près de 4 ans. Cette thèse n'aurait pas pu se faire sans toi. Je tiens à te remercier pour le temps que tu as passé à me transmettre ta passion pour la recherche et l'importance à apporter aux détails. Je ne sais pas si j'ai été à la hauteur de ton enseignement mais sache que tout ce que j'ai appris je te le dois en grande partie. Je suis heureuse et fière d'avoir fait mes premiers pas de scientifique sous la responsabilité d'un mentor tel que toi car je mesure la chance qu'a été la mienne de pouvoir travailler et apprendre à tes côtés. Outre l'aspect scientifique, je voudrais également te remercier pour ton affection, ta disponibilité et ta gentillesse. Beaucoup avant moi t'ont décerné le titre de « maman du labo » et je tiens à confirmer que tu le mérites amplement, et c'est avec beaucoup de joie que je pouvais dire que tu étais « MA maman du labo ». Encore une fois MERCI !

Ma chère Isabelle, je tiens également à t'exprimer toute ma gratitude pour ton encadrement depuis près de 4 ans. Je voudrais te remercier d'avoir été le deuxième pilier de cette thèse. Je suis heureuse d'avoir pu apprendre la biologie moléculaire à tes côtés. Je suis également heureuse d'avoir eu un exemple de femme scientifique comme toi. A mes yeux tu es une « superwoman », je ne sais pas si plus tard je saurais manier de front carrière professionnelle, familiale et prendre le temps de courir ET gagner des marathons, (en fait je peux déjà éliminer le marathon vu ma grande passion pour le sport !!!), mais si j'arrive à avoir le quart de ta réussite je serais déjà contente. Encore une fois MERCI.

Didier, je te remercie de m'avoir accueillie dans l'équipe et de m'avoir permis d'y réaliser ce travail de recherche dans les meilleures conditions. Je te remercie également pour tes précieux conseils. J'ai également pris plaisir à écouter tes nombreux commentaires footballistiques et musicaux.

Isabelle, je voudrais te remercier pour ta gentillesse, ton soutien et tes encouragements. Si j'en suis là aujourd'hui c'est aussi grâce à toi, je suis heureuse d'avoir fait mon premier stage « recherche » sous ta direction, tu m'as donné envie de continuer dans cette voie.

Christophe, merci pour tes conseils mais surtout pour ton humour très carabin qui a su ponctuer les repas du midi.

Jean, merci beaucoup pour ton aide lors de ces nombreux mercredis de sacrifices. Je suis heureuse d'avoir pu assister à tes démonstrations de sacrifice vite fait et bienfait.

## La Dream Team : Anne, Valérie, Capucine et Geoffrey

Vous êtes au laboratoire ce que l'équipe de basket 1992 a été pour les US, ou plus proche de nous, l'équivalent de l'équipe de France de football 1998.

Je voudrais tout d'abord vous remercier pour le soutien technique que vous m'avez apporté. Je n'aurais pas pu m'occuper de tous les animaux toute seule. Si mes calculs sont bons, en 4 ans de master et thèse cumulés, nous avons passé : 1800 heures soit 75 jours à faire : des frottis, des pesées, des OGTT (je me souviens particulièrement de celle du 23 décembre 2010 en compagnie d'Anne, Valérie et Christine), des sacrifices et à annoter des tubes. J'espère que le pic de 326 animaux en même temps ne sera pas le seul souvenir que je vous aurais laissé !!! Personnellement je suis heureuse d'avoir pu partager ses moments en votre compagnie, car en plus de m'avoir transmis votre savoir-faire, vous avez su faire de ces moments fastidieux de véritables instants de joie et de fous rires. Je tiens également à vous remercier pour votre écoute, vos encouragements et votre patience. Le temps passé en votre compagnie restera l'un des meilleurs souvenirs de cette thèse.

A Estelle, merci pour ton aide.

A Delphine ma secrétaire préférée, je te remercie pour ta gentillesse et ton sourire. Si toutes les secrétaires étaient comme toi, je suis sûre qu'il y aurait plus de jours pour fêter les secrétaires.

Je remercie l'ensemble du laboratoire de Biochimie MPMC : Giselle, Maryse, Sophie, Véronique, Catherine et Annie, Pascale et Nadine pour l'accueil chaleureux qu'elles m'ont réservé. Je suis heureuse d'avoir pu partager vos pauses café du midi et pu discuter des choses et d'autres de la vie. J'espère ne pas vous avoir trop ennuyé avec certaines de mes conversations très futiles, mais pour ma part j'ai apprécié chaque moment passé à vos côtés.

Ma très chère Manue, grande prêtresse de la Q-PCR, je suis ravie d'avoir pu apprendre cette technique avec toi. Mais surtout merci pour ta bonne humeur, tes fous rires, ton amitié, ta spontanéité, et tous tes conseils, que j'ai pris grand soin d'appliquer (aussi bien scientifiques que « culinaires »). Grâce à toi, je me sens moins coupable d'être aussi bavarde, et je suis très heureuse d'avoir pu m'épancher de tout mon cœur sur nos très très très nombreux sujets de conversations ! Je suis également ravie d'avoir rencontré ta formidable petite famille.

Ma vie au labo n'aurait pas été la même sans Fabien, Marie-Amélie, Sylvain et JS.

Mon très très très cher Fabien, je ne sais par quel bout commencer pour t'exprimer tout ce que tu m'as apporté pendant ma thèse. Si mes souvenirs sont bons, le premier contact « scientifique » que nous ayons eu fut : «Bonjour la stagiaire, moi c'est Fabien, étudiant en première année de thèse ; pourrais-tu ramasser les cadavres de mes rats morts durant la nuit dans leur cage, car j'aime pas faire ça !!!! ». Avoue qu'il y n'y a pas mieux pour se faire détester de la part de la stagiaire. Mais heureusement que tout évolue ! Au fil du temps tu es devenu un véritable ami. Si j'ai apporté de la couleur à ta thèse, tu m'as apporté mon petit rayon de soleil et surtout beaucoup beaucoup de gaîté. Pour toutes ses raisons MERCI.

A ma super coloc de bureau : Marie-Amélie. Je suis heureuse d'avoir partagé mon bureau avec toi. Je voudrais te remercier pour ton amitié et ton réconfort dans certains moments de désespoir.

Sylvain, tu es certainement l'étudiant le plus passionné par la science qu'il m'ait été de rencontrer. Je suis ravie d'avoir pu faire un petit bout de chemin en ta compagnie. Je voudrais également te remercier de ta gentillesse.

JS, je suis heureuse d'être devenue ta nouvelle coloc de bureau, merci pour ta gentillesse et ton sourire. Regarder des matchs de foot en ta compagnie fut un véritable plaisir.

A Julie la petite dernière du labo qui j'espère restera avec vous ces 3 prochaines années. J'espère que tu prendras autant de plaisir que moi à travailler dans une équipe aussi formidable.

#### A mes amis

A Aurore ma plus vieille amie, merci pour ton amitié indéfectible depuis près de 17 ans.

A Florence, Lulu, Axelle, Klara, Sara et Elodie, vous êtes mes meilleures amies et je voudrais vous remercier toutes d'avoir partagé mon quotidien depuis plus de 13 ans.

Une pensée particulière à Chloé qui est devenue mon amie, je sais que je ne suis pas la meilleure joueuse de squash, mais je promets de m'améliorer pour les prochaines séances.

A Ali, je suis heureuse d'avoir pu partager un nombre incalculable de BoBun en ta compagnie.

Ma très chère Sara, ces dernières années auront été riches en rebondissements et je suis heureuse d'avoir pu les partager avec toi, et surtout grâce à toi j'ai la chance d'être la tata du petit Adam.

Aline, ma coloc préférée (en même temps t'es la seule). J'aurais mis du temps à sauter le pas et quitter le nid familial mais je ne regrette pas d'avoir sauté le pas en ta compagnie. En fait si j'avais su que tu étais aussi mauvaise en culture footballistique j'y aurais réfléchi à deux fois. Voilà tes meilleures perles : -Si je ne connais pas Messi c'est qu'il n'est pas si connu !!!

-Ah oui Messi le Brésilien !!!!

Merci d'avoir été une si bonne amie, de m'avoir supporté et fait rire dans les moments les plus difficiles, et d'avoir supporté ma passion des séries télé ayant rapport aux tueurs en série et autre meurtre avec préméditation, etc. J'espère que tu garderas de notre colocation un aussi bon souvenir que moi.

Une pensée particulière à mon Tonton Sam, pour ses précieux conseils en statistique.

#### A mes sœurs

Mes très chères sœurs : Rahila, Fatou et Myriam, je voudrais vous remercier pour votre soutien, vos sourires et votre bonne humeur. Rahila, même si tu n'étais pas là physiquement j'ai toujours pu compter sur toi pour me remonter le moral, sache que je suis heureuse d'avoir une grande sœur aussi attentionnée et géniale que toi. Fatou, je te remercie pour ton humour incisif (je n'oublie pas le «marie CURIE »), je suis contente d'avoir une petite sœur aussi fantasque que toi. Myriam, ma petite chérie, je suis fière d'être la grande sœur d'une petite fille aussi drôle, gentille et jolie.

#### A mes parents

Je vous suis éternellement reconnaissante pour l'aide et le soutien indéfectible que vous m'avez apportés tout au long de ces longues années d'études. Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous. Je vous remercie de m'avoir écouté me plaindre sans jamais rien dire et su me faire rire dans les moments critiques. Je voudrais profiter de ces quelques lignes pour vous dire que je vous aime et à quel point j'ai de la chance d'avoir des parents aussi formidables que vous.

# SOMMAIRE

## I Le diabète de type 2 : pathologie majeure du XXIe siècle

A) Contexte épidémiologique.....	12
1) Définition du diabète de type 2.....	12
2) Données épidémiologiques.....	12
B) Etiologie du diabète de type 2.....	14
1) Rôle de l'héritabilité.....	14
1a- Prédisposition familiale.....	14
1b- Méthode d'analyses des gènes.....	15
1c- Interaction entre gènes et environnement .....	18
2) Facteurs de risque et diabète de type 2.....	19
2a- Adiposité abdominale .....	19
2b- Facteurs adipocytaires .....	20
C) Transmission maternelle du diabète de type 2.....	22
1) Etudes épidémiologiques.....	22
1a- Etude chez les Indiens Pima.....	22
1b- Etude des cohortes.....	23
1c- Le diabète gestationnel.....	24
2) Les preuves expérimentales : le paradigme du rat GK.....	25
3) Les modèles animaux de diabète pendant la grossesse.....	27
3a- Le diabète chimique : le modèle du rat streptozotocine (STZ).....	27
3b- Les modèles animaux de diabète de type 2.....	31

## **II Nutrition maternelle et programmation du diabète de type 2**

A) Données épidémiologiques.....	33
1) Concept de programmation nutritionnelle : hypothèse de Barker...33	
2) Dysnutrition maternelle et programmation du diabète de type 2.....35	
2a- La sous-nutrition maternelle .....	35
2b- Surabondance nutritionnelle et obésité maternelle .....	37
B) Effets transgénérationnels d'une dysnutrition maternelle : ce qu'apportent les modèles animaux .....	40
1) Modèles animaux de programmation nutritionnelle .....	40
1a- Modèles animaux de dénutrition maternelle.....	40
1b- Modèles animaux de surnutrition maternelle .....	41
2) Dimorphisme sexuel et programmation des maladies métaboliques..	42
3) Les mécanismes épigénétiques de la programmation nutritionnelle..	43

## **III Rôle du placenta dans la programmation fœtale**

A) Placenta et croissance fœtale.....	44
1) Les différents placentas.....	44
2) Développement du placenta chez le rat.....	47
3) Transport placentaire .....	50
3a-Transport d'O <sub>2</sub> .....	50
3b-Transport de nutriments.....	50



B) Altérations placentaires et programmation fœtale.....	52
1) La notion de « cross talk » placentaire .....	52
2) Altérations placentaires et grossesses diabétiques.....	53
3) Altérations placentaires et nutrition maternelle.....	56
3a -Dénutrition maternelle .....	56
3b -Obésité maternelle.....	56
C) Dimorphisme sexuel du placenta.....	57
1) Origine précoce du dimorphisme sexuel.....	57
2) Les gènes soumis à empreinte .....	58
 <b>Partie 1 : Altérations placentaires et fœtales dans un modèle d’hyperglycémie gestationnelle chez le rat : le modèle Nicotinamide-Streptozotocine.</b>	
Introduction.....	60
Objectif.....	62
Article.....	62
Résultats majeurs.....	63
 <b>Partie 2 : Influence d’un régime hyperlipidique sur l’expression génique placentaire et la croissance fœtale chez le rat : impact de la programmation nutritionnelle.</b>	
Introduction.....	65
Matériel et méthodes.....	67
Résultats.....	78
Discussion générale .....	101
Conclusion.....	109

**Figure 1 :** Evolution de la prévalence du diabète dans le monde (en pourcentage) entre 2000 et 2030 et estimation (en millions) du nombre de diabétiques

**Figure 2 :** Prévalence du diabète de type 2 en France et évolution du nombre de personnes atteintes

**Figure 3 :** Pourcentage d'obèses dans le monde en 2012

**Figure 4 :** Evolution de l'obésité en France entre 1997 et 2012 chez l'adulte

**Figure 5 :** Importance de l'influence de l'environnement *in utero* dans le développement du diabète de type 2 dans la descendance : exemple du rat GK

**Figure 6 :** Action cytotoxique de la STZ au niveau de la cellule bêta pancréatique

**Figure 7 :** Concept de programmation nutritionnelle

**Figure 8 :** Courbe de croissance fœtale et limite d'inclusion du RCIU

**Figure 9 :** Courbe de croissance fœtale et limite d'inclusion de la macrosomie

**Figure 10 :** Classification des différents types de placenta

**Figure 11 :** Comparaison des sites de placentation hémochoriale entre l'Homme et le rat

**Figure 12 :** Histologie du placenta de rat

**Figure 13 :** Conséquences phénotypiques de la délétion génique de l'IGF

**Figure 14 :** Cross talk de l'unité materno-fœto-placentaire

**Figure 15 :** Altérations placentaires de l'axe insuline/IGF factor dans les grossesses diabétiques

**Figure 16 :** Mécanisme d'action du Nicotinamide sur les effets cytotoxiques de la streptozotocine au niveau de la cellule bêta pancréatique

**Figure 17 :** Schéma du protocole expérimental

**Tableau 1:** Identification des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 et facteurs de risque des allèles

**Tableau 2 :** Classification du poids chez les adultes en fonction de l'IMC

**Tableau 3 :** Modèles d'induction du diabète par administration de Streptozotocine

# **I Le diabète de type 2 : pathologie majeure du XXI<sup>e</sup> siècle**

## **A) Contexte épidémiologique**

### **1) Définition du diabète de type 2**

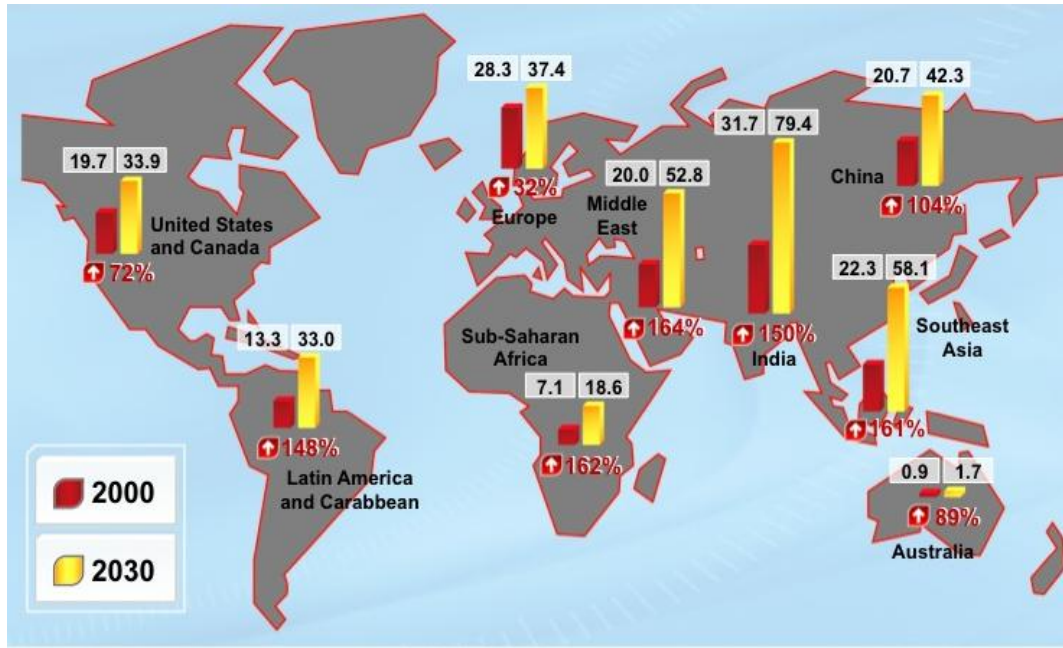
Le diabète de type 2 est une maladie hétérogène présentant diverses variantes associées à deux traits phénotypiques : un dysfonctionnement des cellules bêta pancréatiques, mis en évidence par une sécrétion sub-optimale de l'insuline, et une résistance à l'insuline des tissus cibles périphériques (foie, muscle squelettique, tissu adipeux blanc). L'apparition de l'hyperglycémie est due à l'effondrement progressif de la production d'insuline, résultant de l'incapacité des cellules bêta à s'adapter au long cours à l'insulinorésistance. Ainsi, il est généralement admis que la résistance à l'insuline est un événement qui intervient très tôt dans le développement du diabète (Danaei et al., 2011).

Le déclin de la fonction des cellules bêta pancréatiques est un phénomène tardif engendré en partie par la perte irréversible de la masse des cellules bêta par apoptose. Le diabète de type 2 a longtemps été considéré comme une maladie chronique évolutive, capable d'amélioration mais sans franche guérison. Une augmentation progressive de la glycémie plasmatique a lieu indépendamment du degré de contrôle glycémique ou du type de traitement (Forbes and Cooper, 2013). La fonction des cellules bêta décroît linéairement avec le temps (Nichols and Remedi, 2012; Raducanu and Lickert, 2012) et au bout de 10 ans, plus de 50% des patients diabétiques ont recouru à l'insulinothérapie.

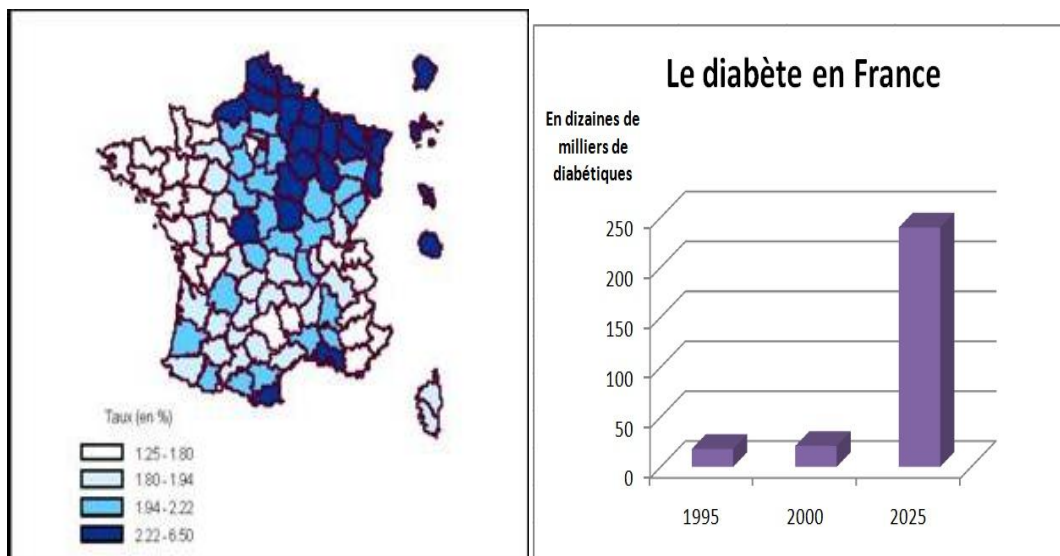
### **2) Données épidémiologiques**

En moins d'une génération, entre 1985 et 2005, la prévalence mondiale du diabète est passée de 0.6% à 5.9%. En 1985, on comptait près de 30 millions de personnes atteintes à travers le monde. A l'heure actuelle, 366 millions de personnes soit 8.3% de la population mondiale présenteraient un diabète de type 2. Cette pathologie constitue une véritable épidémie mondiale non seulement du fait de sa progression perpétuelle dans les pays occidentaux mais également dans les pays en émergence où l'augmentation est la plus forte (Figure 1). En France, on compte 2.5 millions de diabétiques en 2012 avec une répartition territoriale inégale, le Nord et l'Est du pays ayant une prévalence plus importante (Figure 2).

**Figure 1: Evolution de la prévalence du diabète dans le monde (en pourcentage) entre 2000 et 2030, et estimation (en millions) du nombre de diabétiques**



**Figure 2: Prévalence du diabète de type 2 en France et évolution du nombre de personnes atteintes**



L'accroissement exponentiel et de type « épidémique » du diabète de type 2 ne peut être expliqué par des variations génétiques classiques du génome humain sur une période aussi courte. Hormis l'augmentation du nombre d'individus et le vieillissement de la population, des modifications du mode de vie sont susceptibles d'affecter un génome prédisposé et contribuent ainsi au développement des maladies métaboliques dans la population adulte.

## **B) Etiologie du diabète de type 2**

### 1) Rôle de l'héritabilité

#### 1a-La-prédisposition familiale

L'analyse de transmission familiale d'une maladie permet d'évaluer la distribution des individus atteints de la maladie au sein d'une même famille. Pour démontrer l'existence d'une prédisposition familiale à une maladie, on étudie la prévalence de la maladie chez les différents membres de la famille. Les études épidémiologiques ont permis de démontrer que la prévalence du diabète de type 2 chez les apparentés du premier degré des personnes diabétiques (parents, frères, sœurs ou enfants) était supérieure à celle des apparentés du 1<sup>er</sup> degré des témoins sains ou à celle de la population générale (McCulloch et al., 2011; Williams et al., 2003). L'agrégation familiale est souvent mesurée par le risque relatif «familial» appelé  $\lambda_s$  (lambda sibs). Le risque relatif  $\lambda_s$  définit le rapport de la prévalence de la maladie chez les apparentés du 1<sup>er</sup> degré sur la prévalence de la maladie dans la population générale ou chez les apparentés des témoins. Cette valeur représente le risque pour un germain d'être atteint. Lorsque la valeur est égale à 1, il n'y a aucune agrégation familiale.

Dans la population européenne, la valeur du risque relatif  $\lambda_s$  pour le diabète de type 2 est approximativement de 3,5 (Kobberling and Rotenberger, 1992). Cette faible valeur suppose l'existence d'une variable « non mesurable » qui exprime la susceptibilité d'un individu à la maladie. En effet, la susceptibilité à développer un diabète de type 2 dépend d'une hérédité polygénique, et de l'interaction entre ces gènes et l'environnement. L'agrégation familiale reflète les effets conjoints des facteurs génétiques et environnementaux communs aux membres d'une même famille.

L'étude de jumeaux a permis d'évaluer l'héritabilité d'une maladie, du fait que les jumeaux monozygotes possèdent les mêmes gènes et par comparaison aux jumeaux dizygotés, qui sont eux frères et sœurs nés en même temps. La plupart des études menées sur les

jumeaux monozygotes ont montré un taux de concordance supérieur chez les monozygotes comparé aux jumeaux dizygotes (50 à 90%) (Newmann and Campbell, 1987), Kaprio et al 1992, Koskenvuo et al., 1992). De même, une forte concordance est observée en ce qui concerne la tolérance au glucose chez les jumeaux monozygotes comparativement aux jumeaux dizygotes 61% vs 41% (Poulsen et al., 1999). Cependant le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes ne signifie pas nécessairement qu'une pathologie est d'origine génétique, car les jumeaux partagent également le même environnement dans les premières années de leur vie. La concordance pourrait donc résulter d'une similarité génétique et / ou environnementale. En revanche à l'âge adulte, la plupart des jumeaux vivent séparément, et en conséquence la concordance penche plutôt pour un effet génétique. Il faut donc s'intéresser à la discordance chez les jumeaux monozygotes durant l'enfance et à la concordance à l'âge adulte (McCulloch et al., 2011).

### 1b-Méthodes d'analyse des gènes

Le rôle important de l'héritabilité dans l'étiologie du diabète de type 2 est largement démontré par les récentes études d'associations génétiques. Deux stratégies sont élaborées afin d'identifier les gènes de susceptibilité du diabète de type 2.

#### -1 Stratégie des gènes candidats :

Cette approche, qui consiste à supposer l'implication d'un gène connu dans les processus physiopathologiques étudiés puis à confirmer cette implication a posteriori, a permis d'identifier 4 gènes à risque : WFS 1, PPARG, HNF1B ou TCF2 et KCJN11 (tableau1). Le faible pouvoir statistique des différentes études et les limites dans la connaissance de l'étiologie du diabète de type 2 expliquent en partie le petit nombre de gènes identifiés par cette approche.

#### -2 Stratégie du génome entier :

A l'instar de nombreuses pathologies multifonctionnelles, le diabète de type 2 est associé à de multiples variations de la séquence d'ADN dites SNP fonctionnels. Les SNPs (Single nucleotide polymorphism) correspondant à la variation d'un seul nucléotide (généralement biallélique) et représentent 90% de l'ensemble des variations du génome humain.

Les nouvelles technologies génomiques à haut débit ont permis d'étudier à grande échelle la variabilité du génome car on peut étudier en même temps des centaines de milliers, voire un

million de SNPs. Ces technologies ont ouvert la voie aux études d'association pangénomique (GWAs = genomewide association study) et à la caractérisation systématique des variations génétiques, afin d'établir les corrélations entre SNP et traits phénotypiques. Les puces à ADN de haut débit permettent le ciblage de 300 K à millions de SNPs, les études cas-témoins se sont adressées au criblage du génome entier. Dans ce contexte, des projets internationaux tels que le HumanGenomeSequencing Project et le HapMap(Conrad et al., 2010) ont été mis en œuvre et ont contribué à la compréhension des variations de séquences. Les GWAs menées dans des populations européennes,(Gudmundsson et al., 2007; Steinthorsdottir et al., 2007) et au Japon (Unoki et al., 2008),ont permis d'identifier de nombreux variants liés au diabète de type 2. Dans le cadre d'un consortium (DIAGRAM), une méta-analyse réalisée à partir des différents résultats des GWAs a permis l'identification de nouveaux gènes associés au diabète de type 2(Dupuis et al., 2010). A l'heure actuelle, 21 gènes cibles ont été identifiés, dont la plupart semblent d'avantage affecter la sécrétion d'insuline que la résistance à l'insuline (Tableau 1). Il apparaît clairement que la masse des cellules bêta pancréatiques et/ou leur capacité de différenciation constitue un facteur déterminant dans l'apparition du diabète de type 2.

Prises individuellement, ces variations de l'ADN ont un effet modéré sur la fonction et/ou l'expression des gènes incriminés. Mais pris dans leur ensemble, ces variations augmentent d'autant plus le risque de l'individu à développer la pathologie lorsque celui-ci évolue dans un environnement délétère (interaction gènes–environnement).



**Tableau 1:** Identification des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 et facteurs de risque des allèles

Gène	Chr	Index SNP (app, RAF in Europeans)	Méthode d'identification	Facteurs de risques des allèles
WFS1	4	rs10010131 (60%)	Candidate gène	↓ de la stimulation de la sécrétion d'insuline par les incrétines,
PPARG	3	rs1801282 (80%)	Candidate gène	↓ de la sécrétion d'insuline du corps entier, ↓ de la sensibilité l'insuline du tissu adipeux
HNF1β (TCF2)	17	rs757210 (40%)	Candidate gène	inconnu
KCNJ11	11	rs5219 (50%)	Candidate gène	↓ de la sécrétion d'insuline, ↓ de la sécrétion des incrétines
TCF7L2	10	rs7901695 (30%)	Linkage peak fine-mapping	↓ de la sécrétion d'insuline stimulée par les incrétines, ↓ de la conversion de la proinsuline, ↓ de la sensibilité générale à l'insuline, ↓ de la sensibilité hépatique à l'insuline
CDKN2A/B	9	rs10811661 (80%)	GWA	↓ de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose
CDKAL1	6	rs10946398 (30%)	GWA	↓ de la sécrétion d'insuline stimulé par le glucose, ↓ de la conversion de la pro insuline
SLC30A8	8	rs13266634 (70%)	GWA	↓ de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, ↓ de la conversion de la pro insuline
IGF2↓P2	3	rs4402960 (30%)	GWA	↓ de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose
HHEX/IDE	10	rs5015480 (60%)	GWA	↓ de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose
FTO	16	rs8050136 (40%)	GWA	↑ de la masse général de gras, ↑ de la prise énergétique, ↓ de la sensibilité cérébrocorticale à l'insuline
KCNQ1	11	rs2237892 (90%)	GWA	↓ de la sécrétion d'insuline,
MNTR1B	11	rs1083963 (30)	GWA	↓ de la sécrétion d'insuline stimulé par le glucose
NOTCH2	1	rs10923931 (10)	GWA meta-analysis	inconnu
CDC1231/CAMK1D	10	rs1277979 (20%)	GWA meta-analysis	↓ de la sécrétion d'insuline
ADAMTS9	3	rs4607103 (80%)	GWA meta-analysis	inconnu
THADA	2	rs7578597 (90%)	GWA meta-analysis	inconnu
TSPAN8/LGR5	12	rs7661581 (30%)	GWA meta-analysis	↓ de la sécrétion d'insuline
JAZF1	7	rs864745 (50%)	GWA meta-analysis	↓ de la sécrétion d'insuline
CAPN10	2	rs3792267 (70%)	GWA meta-analysis	↓ de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, ↓ de la conversion de la proinsuline, ↓ de la sensibilité générale à l'insuline, ↓ de la sécrétion d'insuline
ENPP1	6	rs1044498/K121Q (10%)	GWA meta-analysis	↓ de la sensibilité générale à l'insuline, ↓ de la sécrétion à l'insuline

## 1c-Interaction entre gènes et environnement

Les facteurs environnementaux et le style de vie de l'individu demeurent à présent les meilleurs facteurs « discriminants » du développement du diabète de type 2 (Staiger et al., 2009). La sédentarité, la surabondance de l'offre alimentaire ainsi que la destruction du rythme des prises alimentaires favorisent le développement de nombreux troubles métaboliques.

Les premières observations incriminant le rôle de l'environnement (socioculturel, physiologique, nutritionnel) proviennent des études épidémiologiques réalisées dans certaines minorités ethniques telles que les Aborigènes d'Australie et les Indiens Pima. Chez les Indiens Pima, un peuple amérindien vivant de part et d'autre de la frontière entre le Mexique et les Etats-Unis, la prévalence du diabète de type 2 est de l'ordre de 21%. La prévalence est sensiblement plus forte chez les Indiens Pima vivant du côté américain comparée à ceux vivant du côté mexicain (21% vs 5 %). Cette disparité s'explique en partie par le mode de vie totalement opposé de ces deux populations. Les Indiens Pima vivant du côté mexicain mènent une vie rurale qui se caractérise par un régime alimentaire sain, et une activité physique intense, tandis que ceux vivant aux Etats-Unis ont adopté un mode de vie sédentaire sans activité physique et se nourrissent exclusivement d'aliments hypercaloriques (gras, sucre) (Dabelea et al., 1998). De la même manière, une forte augmentation de la prévalence du diabète de type 2 a été observée dans les populations ouest africaine et sud asiatique, (ie diaspora africaine asiatique) qui ont adopté un mode de vie occidental ou vivent dans les pays occidentaux, comparativement à celles restées dans leur pays d'origine (Mathers, 1995; Miller et al., 1995),(Ramachandran et al., 1992).

En 1962, Neel propose l'hypothèse du « thrifty génotype » ou « génotype économe » comme explication du taux élevé de diabète de type 2 dans ces populations (Neel, 1962). Il postule alors que les gènes dits « diabétogènes » ont persisté chez ces individus à un taux élevé, car ils représentent un avantage de survie dans les temps de privation de nourriture, mais sont devenus délétères quand l'individu se trouve exposé à une alimentation hypercalorique. Cette hypothèse est largement confirmée depuis par la démonstration récente d'une augmentation rapide de la prévalence du diabète de type 2 chez les juifs éthiopiens réfugiés en Israël suite à la famine qui frappa leur pays (Zung et al., 2004).

## 2) Facteurs de risque et diabète de type 2

### 2a -Adiposité abdominale

Le diabète de type 2 peut apparaître sans excès de poids, cependant 90% des diabétiques de type 2 sont en surpoids et /ou obèses, et généralement la majorité des personnes obèses ne deviennent pas diabétiques. Néanmoins l'obésité, qui est en augmentation incessante dans les pays développés et plus récemment dans les pays en émergence (ie Chine, Brésil, Mexique), contribue de manière significative à l'explosion du diabète de type 2 dans le monde (Hu, 2003).

L'obésité, liée en partie à l'expansion du tissu adipeux blanc, a été initialement définie à partir du calcul de l'indice de masse corporelle (IMC) (tableau 2)(Owen et al., 2009).

**Tableau 2** : Classification du poids chez les adultes en fonction de l'IMC

<b>Indice de masse corporelle (en kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Classification</b>	<b>Risque de développer des problèmes de santé</b>
<18,5	Poids insuffisant	Accru
18,5 à 24,9	Poids normal	Moindre
25,0 à 29,9	Excès de poids	Accru
≥ 30,0 :	Obèse :	
30,0 à 34,9	Obèse classe I	Élevé
35,0 à 39,9	Obèse classe II	Très élevé
≥ 40,0	Obèse Morbide	Extrêmement élevé

Cependant l'IMC ne tient compte ni de la masse maigre (en particulier la masse musculaire), ni du type d'obésité viscérale ou sous cutanée. Pour cette raison, l'indice d'adiposité corporelle (IAC) qui se calcule par : la circonférence des hanches / (taille X  $\sqrt{\text{taille}}$ ) -18 et qui tient compte de la masse grasse abdominale a été introduit en 2011 (Bergman et al., 2011). Le schéma d'accumulation des lipides diffère entre les deux sexes. Les femmes développent plus souvent une adiposité périphérique qui se traduit par une accumulation de gras glutéal, alors que les hommes sont sujets à une obésité androïde (Janghorbani et al., 2012). Cependant, les deux types d'obésité sont retrouvés aussi bien chez l'homme que chez la femme. L'obésité androïde est fortement liée à une augmentation du risque de mortalité par maladies cardiovasculaires et diabète de type 2.

Le tissu adipeux est non seulement un tissu impliqué dans le stockage des lipides neutres mais également une glande endocrine très active sécrétant un certain nombre de facteurs qui reflètent le statut métabolique des adipocytes. Ces facteurs endocriniens contribuent ainsi à la formation d'un réseau complexe entre d'une part le tissu adipeux et les autres organes périphériques du métabolisme (les muscles squelettiques, le foie, l'intestin, le pancréas), et d'autre part entre le tissu adipeux et le système nerveux central. L'obésité, mais également la résistance à l'insuline, seraient en grande partie en rapport avec un dérèglement de ce dialogue tant au niveau central que périphérique.

## 2b- Facteurs adipocytaires

La graisse viscérale est non seulement une source importante d'acides gras libres mais en tant que glande endocrine elle secrète un certain nombre d'adipokines qui agissent comme facteurs de l'inflammation (TNF $\alpha$ , IL6) et comme modulateurs de la sensibilité périphérique à l'insuline à effet insulinosensible (adiponectine, leptine, apeline, visfatine, omentine ou insulinoresistantresistin, TNF $\alpha$ , IL6). Ces molécules sont directement libérées dans la veine porte, et véhiculées jusqu'au foie où elles interfèrent en premier lieu avec le métabolisme hépatique du glucose et des lipides.

Figure 3 : Pourcentage d'obèses dans le monde en 2012

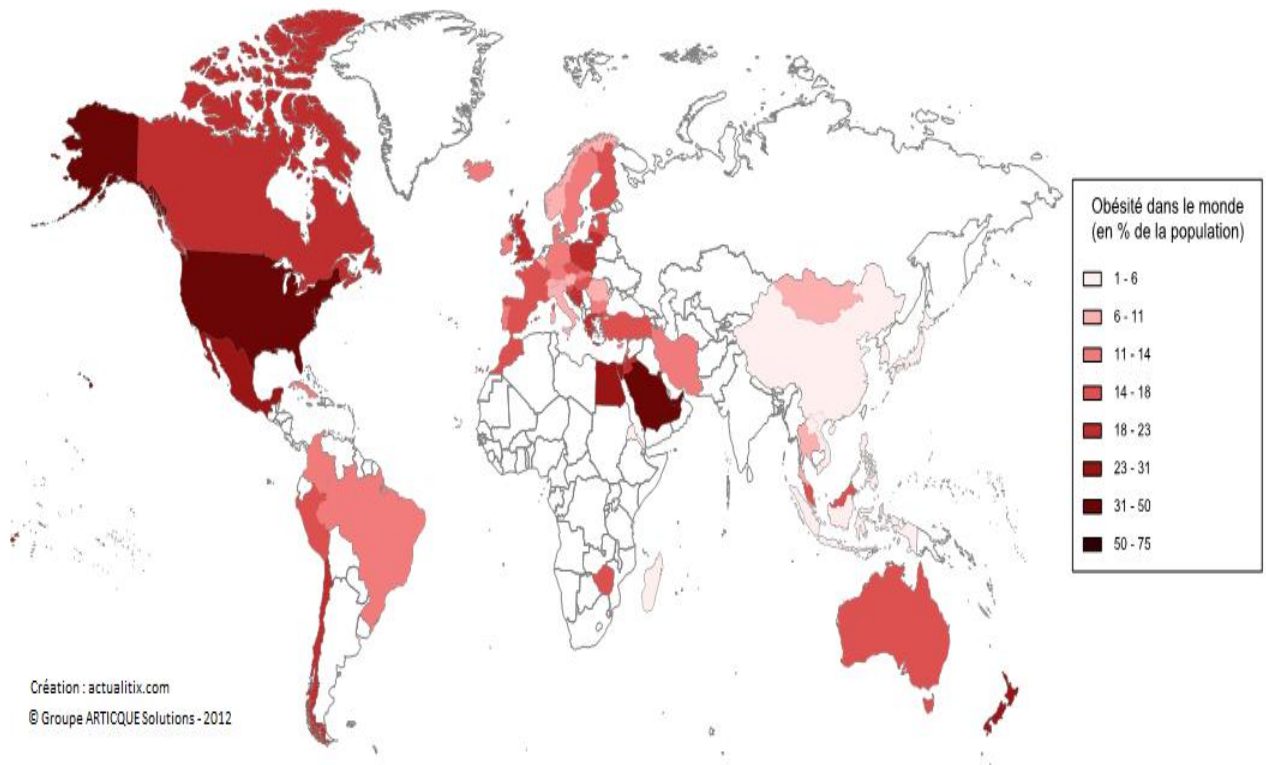


Figure 4 : Evolution de l'obésité en France entre 1997 et 2012 chez l'adulte



Etude trisannuelle obEpi-Roche 2012

Le TNF $\alpha$  en inhibant les voies de signalisation de l'insuline participe à l'insulinorésistance hépatique tandis que l'IL6 agit directement sur le métabolisme glucidique et lipidique (Trayhurn and Wood, 2004; Tsigos et al., 1997; Tsigos et al., 1999b). Les cytokines proinflammatoires secrétées par le tissu adipeux sont proportionnelles à l'accumulation de graisse corporelle et sont corrélées à l'IMC (Trayhurn and Wood, 2004; Tsigos et al., 1999a). Les adipokines agissent également sur le muscle et le pancréas et contribuent à l'insulinorésistance périphérique.

## **C) Transmission maternelle du diabète de type 2**

### 1) Etudes épidémiologiques

L'épidémie de diabète qui s'est développée sur une période de vie aussi courte, s'explique en partie par les facteurs génétiques et le mode de vie de l'individu. Cependant la sensibilité à l'une des maladies les plus répandues dans le monde peut aussi être transmise de la mère à l'enfant par des influences environnementales « *in utero* ».

Il y a plus de trente cinq ans, Dorner et collaborateurs suggéraient que la susceptibilité au diabète pouvait être acquise *via* la transmission *in utero* de la mère à l'enfant, en démontrant que les enfants nés de mère diabétique (diabète de type 1 ou diabète de type 2) avaient plus de risque de développer à l'âge adulte un diabète, que les enfants nés de père diabétique. Il proposa la possibilité d'un mode d'hérédité épigénétique (tératogénique) et postula même que l'influence du diabète maternel pouvait s'étendre au-delà de la première génération. Depuis, de nombreuses études sont venues conforter cette théorie (Alcolado and Thomas, 1995; Alcolado et al., 1995) et la majeure partie d'entre elles ont démontré l'influence du diabète maternel sur la transmission de la maladie dans la descendance.

#### 1a-Etude chez les Indiens Pima

Les premiers arguments en faveur du rôle délétère de l'environnement diabétique *in utero* sont apportés par les études des Indiens Pima. La prévalence du diabète de type 2 chez les individus âgés de 20-24 ans, est de 45% chez les descendants de mère ayant développé un diabète avant ou pendant la grossesse, contre 9% chez les descendants de mère dont le diabète a été diagnostiqué après la grossesse (Dabelea et al., 1998). Cette prévalence atteint 70% chez les descendants de mère diabétique, contre 15% chez les descendants non exposés, pour la

tranche d'âge 25-34 ans. Cependant dans cette population, les effets de l'exposition intra-utérine peuvent être confondus avec les facteurs génétiques. En effet, les mères qui développent précocement un diabète porteraient un plus grand nombre de gènes de susceptibilité au diabète par rapport à celles qui le développe après la grossesse. Afin de déterminer le rôle de l'environnement intra-utérin diabétique *per se*, la prévalence a été comparée dans la fratrie née avant et après le diabète de leur mère. Le risque de développer un diabète est quatre fois plus élevé chez les individus exposés *in utero* au diabète maternel par rapport à leurs frères et sœurs nés avant le diagnostic du diabète de la mère. (Dabelea, 2007; Dabelea and Pettitt, 2001).

### 1b-études des cohortes

La contribution de l'influence maternelle et paternelle dans la transmission du diabète de type 2 a été évaluée à partir de la cohorte de Framingham. Cette étude qui portait sur 1300 couples, dont l'un des partenaires présente un diabète de type 2, montre que sur les 2527 enfants suivis (âge moyen 54 ans), 8.6% ont développé un diabète de type 2 et 11.4 % présentaient une anomalie de la tolérance au glucose. Cependant, bien que le risque de développer un diabète ne fût pas plus élevé chez les enfants dont la mère était diabétique, ces derniers présentaient d'avantage de troubles de la tolérance au glucose que les enfants nés de père diabétique. L'étude CODIAB menée en France sur 536 patients diabétiques de type 2, (âgés de 35 à 74 ans), montre une forte influence maternelle sur la transmission du diabète de type 2. Parmi ces patients diabétiques, la plus grande majorité (deux fois plus) d'entre eux avait une mère diabétique. De plus, le risque de diabète dans leur descendance était supérieur chez les femmes comparé aux hommes. Un certain nombre d'études réalisées dans les populations non européennes plaident également en faveur d'une forte transmission maternelle du diabète. Une étude menée en Inde chez les descendants de mère diabétique rapporte que les enfants, et particulièrement les filles, sont en surpoids et présentent une augmentation de la pression artérielle et une insulino-résistance par rapport aux enfants nés de mère non diabétique. En outre, cette étude montre également que les enfants nés de père diabétique sont susceptibles de développer une légère adiposité et une insulino-résistance modérée (Krishnaveni et al., 2010a; Krishnaveni et al., 2010b). Récemment, plusieurs études remettent en question ce mode de transmission exclusivement d'origine maternelle du diabète de type 2. Le diabète de la mère mais également celui du père serait associé à un risque équivalent voire même additif pour la descendance, de développer un diabète de type 2 (Cross et al., 2009; Crossley and Upsdell, 1980).

Quoi qu'il en soit, l'exposition *in utero* au diabète de la mère en tant que facteur environnemental, peut en partie expliquer l'importance de la transmission maternelle. A l'instar des études réalisées chez les Indiens Pima, les effets de l'exposition intra-utérine au diabète maternel peuvent être confondus avec les facteurs génétiques. Les mères qui sont diabétiques au moment de la grossesse ont en effet développé un diabète plus précocement, et peuvent donc porter davantage de gènes de susceptibilité que celles qui développent un diabète plus tardivement.

### 1c-Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel (DG) est défini par l'OMS comme un trouble de la tolérance au glucose débutant ou diagnostiqué pour la première fois lors de la grossesse et évoluant vers une hyperglycémie de sévérité variable. Même si le diabète gestationnel apparaît au cours de la grossesse, il traduit en fait un trouble métabolique glucidique sous jacent et non diagnostiqué. La prévalence du DG est estimée entre 5 et 6% dans la population générale, mais peut atteindre 21% dans certaines populations à risque. En outre le diabète gestationnel s'avère être en forte augmentation chez les jeunes femmes en âge de procréer et présentant une surcharge pondérale et/ou une obésité (Buchanan et al., 2007).

L'étiologie du diabète gestationnel est bien décrite, et en rapport avec les modifications métaboliques qui accompagnent la grossesse. En fin de grossesse se met en place un état d'insulinorésistance chez la mère qui favorise la lipolyse au niveau du tissu adipeux, et augmente la glycémie. Ces adaptations physiologiques permettent une meilleure disponibilité en nutriments (acides gras, glucose) au fœtus. Afin de maintenir l'homéostasie glucidique et d'éviter l'hyperglycémie, les cellules bêta, sous effet des hormones placentaires (placental growth factor, lactogen placenta) prolifèrent et sécrètent d'avantage d'insuline (Reece et al., 2009). L'hyperinsulinémie réactionnelle qui apparaît au cours du 3<sup>e</sup> trimestre de la grossesse correspond donc à un processus d'adaptation destiné à compenser l'état d'insulinorésistance. Dans le DG, il apparaît que le niveau d'insulinorésistance de la mère est augmenté tandis que la capacité insulinosécrétoire des cellules bêta est considérablement amoindrie. En conséquence, l'incapacité des cellules bêta pancréatiques à faire face à l'insulinorésistance, expose la mère à des épisodes d'hyperglycémie postprandiale. À ce titre, le diabète gestationnel constitue un état métabolique permettant d'évaluer le rôle de l'environnement «diabétique intra-utérin» *per se* sur la transmission du risque du diabète dans la descendance. À l'instar du diabète de type 2, le DG a des conséquences délétères sur



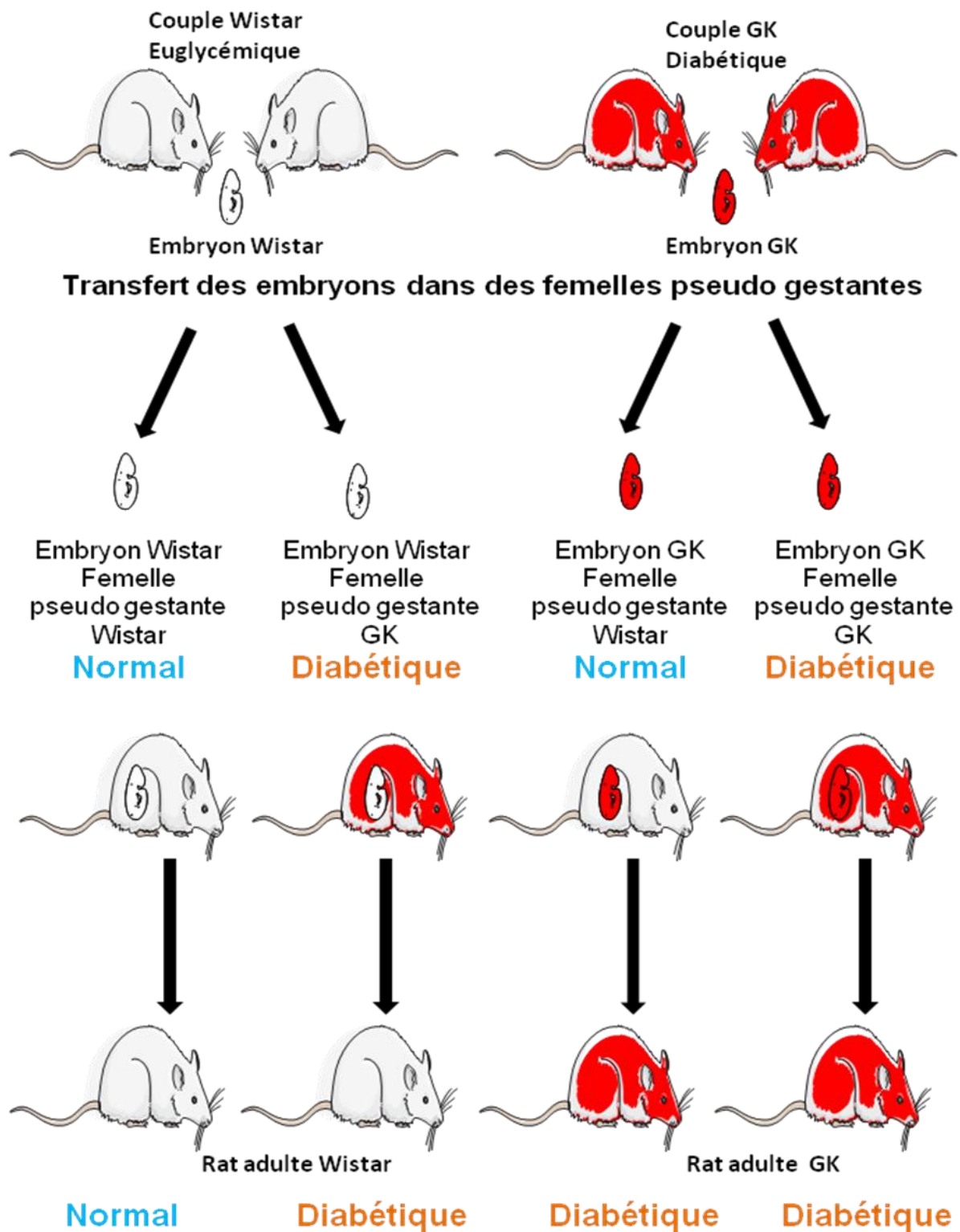
le devenir de la grossesse aussi bien chez la mère que chez le fœtus. De plus, il existe une relation étroite entre le niveau glycémique de la mère pendant la grossesse et la survenue de complications fœtales telles que mortalité périnatale, macrosomie, hyperinsulinémie et adiposité chez le fœtus.

## 2) Les Preuves expérimentales de la transmission du diabète de type 2 : le paradigme du rat GK

Le rat GK est un modèle spontané de diabète de type 2 sans obésité. Il fut établi en 1973 par Goto et Akiaki sur la base de la sélection de rats Wistar qui présentaient une tolérance anormale au glucose et qui ensuite ont été croisés entre eux sur plusieurs générations. Le rat GK développe une intolérance au glucose dès la deuxième semaine de vie postnatale, et présente à l'âge adulte une diminution de 60% de la masse des cellules bêta pancréatiques ainsi qu'une perte de la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques (le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux)(Portha, 2005; Portha et al., 1976). Le défaut de sécrétion d'insuline et la production hépatique de glucose constituent les déterminants majeurs du développement précoce de l'hyperglycémie et du diabète dans ce modèle.

Dans une étude initiale, il a été montré que la descendance issue d'un croisement entre un mâle Wistar contrôle et une femelle Wistar GK, présentait une hyperglycémie plus importante que celle issue d'un croisement entre une femelle Wistar contrôle et un mâle Wistar GK. Cette observation mettait en évidence pour la première fois le rôle délétère de l'exposition *in utero* au diabète dans un modèle animal de diabète spontané. Mais là encore, les facteurs génétiques demeuraient un facteur confondant. Pour s'affranchir de la composante génétique, des études de transfert d'embryons de rat GK ou de rat contrôle Wistar, chez des femelles pseudo-gestantes GK ou contrôles Wistar ont été réalisées par Gill-Randall et al (Gill-Randall et al., 2004). Puisque le rat GK est issu de souche Wistar, aucun problème de compatibilité ne s'oppose donc à ce transfert d'embryon. Des femelles contrôles Wistar euglycémiques et des femelles GK diabétiques subissent une super ovulation, puis sont accouplées respectivement avec des mâles contrôles Wistar ou des mâles GK respectivement (Figure 5). Les embryons issus des couples de rats Wistar et GK sont alors transférés soit chez des femelles pseudo-gestantes Wistar euglycémiques, soit chez des femelles pseudo-gestantes GK diabétiques

**Figure 5 : Importance de l'influence de l'environnement *in utero* dans le développement du diabète de type 2 dans la descendance : expériences de transfert d'embryons chez le rat GK**



D'après Randall et al 2008.

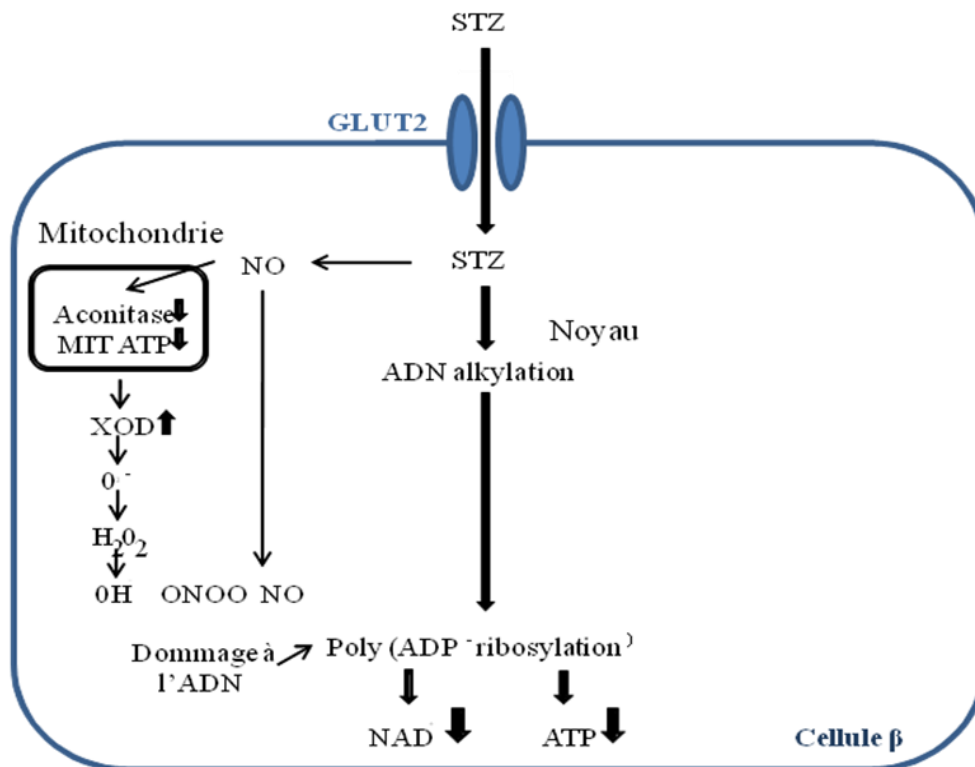
A l'âge adulte (6 mois), les rats provenant d'embryons contrôles Wistar et transférés chez une femelle GK pseudo-gestante deviennent diabétiques, alors que les rats provenant d'embryons Wistar non manipulés ou d'embryons Wistar transférés chez une femelle pseudo-gestante Wistar sont normoglycémiques. Ces résultats plaident en faveur du rôle de l'environnement intra utérin dans la susceptibilité à développer un diabète, du fait que les rats Wistar qui présentent un risque génétique très faible, développent malgré tout à l'âge adulte un diabète quand ils sont exposés *in utero* au diabète de la mère. Ces données renforcent le concept de « fuel-mediated teratogenesis » qui postule que l'exposition intra-utérine à l'hyperglycémie cause des dommages à long terme sur le développement de l'embryon. Par ailleurs, les embryons GK transférés chez une femelle pseudo gestante Wistar euglycémique présentent à l'âge adulte une hyperglycémie modérée et stable qui suggère malgré tout l'implication du fond génétique dans le développement du diabète de type 2 chez le rat GK (Gauguier et al., 1996).

### 3) Les modèles animaux de diabète pendant la grossesse

#### 3a-Le diabète chimique : le modèle du rat streptozotocine (STZ)

La streptozotocine STZ a été largement utilisée pour induire un diabète insulino-prive chez l'animal. La streptozotocine est un antibiotique naturel d'origine bactérienne (*Streptomyces achromogenes*), dont la structure est proche d'un agent alkylant de l'ADN, le N-acetylglucosamine (Bolzan and Bianchi, 2001; Szkudelski, 2001). La STZ pénètre dans la cellule en se fixant sur le transporteur de glucose GLUT 2, présent en abondance sur la membrane de la cellule bêta. Dans la cellule bêta, la STZ agit en tant qu'agent alkylant et provoque la fragmentation de l'ADN. Les dommages subis par l'ADN cellulaire entraînent la mise en place de mécanismes de défense qui font intervenir des enzymes spécifiques telles que les poly ADP ribose polymérase (PAPR) chargées d'éliminer les cassures ou les bases endommagées. Dans la cellule bêta, l'enzyme PAPR1 catalyse le transfert du groupement ADP ribose contenu dans la molécule de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), sur diverses protéines moléculaires (histone, ADN polymérase). Les histones H1 et H2B figurent parmi les cibles de PAPR-1. Le transfert du groupement ADP-ribose sur l'histone H1 entraîne une relaxation de la chromatine, ce qui facilite l'accès des protéines participant à la réparation. Le reste de la molécule de NAD, à savoir le nicotinamide, est libéré dans la cellule. Cette enzyme, au même titre que d'autres agents destructeurs du NAD, entraînent la déplétion en NAD de la cellule bêta.

**Figure 6 : Action cytotoxique de la STZ au niveau de la cellule Bêta**



Par conséquent, la captation de la STZ par la cellule bêta induit l'activation de l'enzyme de PAPR-1 responsable de la consommation de NAD et aboutit à un déficit en ATP dans la cellule (Figure 6). La STZ réduit donc la consommation d'oxygène dans la mitochondrie et abaisse le potentiel membranaire mitochondrial. Les effets de la STZ sont particulièrement prononcés dans les cellules sécrétant l'insuline, à la différence d'autres tissus exprimant également l'isoforme du transporteur de Glut 2, comme le foie, le cœur ou le rein, du fait du pouvoir antioxydant réduit que présente la cellule bêta. Par ailleurs, l'effet diabétogène de la STZ, s'exercerait également via l'activation de la kinase C Jun N-terminal (JAK) connue pour participer au processus d'apoptose (Szkudelski and Szkudelska, 2002).

Les différentes approches expérimentales couramment utilisées pour établir un modèle de diabète pendant la grossesse sont représentées dans le tableau 3 (Portha et al., 1989; Portha et al., 1982; Portha et al., 2012). Tous ces modèles expérimentaux partagent à des degrés variables les mêmes caractéristiques métaboliques, à savoir insulinopénie et hyperglycémie, y compris ceux dont la régénération partielle des cellules bêta est observée (ie injection STZ en

période néonatale) ou ceux dont les dommages subis par la molécule d'ADN sont réduits (ie injection de faibles doses de STZ chez la souris). L'administration de STZ à des femelles gestantes aboutit à un diabète insulino-prive, beaucoup plus proche du diabète de type 1 que du diabète de type 2 ou du diabète gestationnel. Toutefois, selon le mode d'administration, la période d'administration et la dose administrée, les effets de la STZ sur le pancréas endocrine de la mère sont responsables d'hyperglycémie gestationnelle de sévérité variable. En outre, la vulnérabilité à cette toxine s'avère être différente selon les souches de rats (Szkudelski, 2012).

**Tableau 3 : Modèles d'induction du diabète par administration de Streptozotocine**

<b>Période d'administration</b>	<b>Dose de STZ (mg/kg)</b>	<b>Voie d'administration</b>	<b>Espèces</b>	<b>Phénotypes</b>	<b>Complications observées</b>
Post-natale	1x90-100mg/Kg	Sous-scapulaire	Rat	Diabète Modéré/Sévère	
Quelques jours avant l'accouplement	1 x 40-45 mg/Kg 1x 50-75 mg/Kg	Intra péritonéale Intra veineuse	Rat	Diabète Sévère	Malformations congénitales Défaut utéro-placentaire
	1x200-240 mg/Kg	Intra-péritonéal	Souris	Diabète Sévère	Malformation congénitales Défaut utéro placentaire
	1x 45 mg/Kg +insuline jusqu'au premier jour de gestation  1x 100 mg/Kg +insuline jusqu'au premier jour de gestation	Intra veineuse  Intra veineuse	Rat  Souris	Diabète Sévère	Malformations congénitales
	3x75-90 mg/Kg	Intra veineuse Intra-péritonéale	Souris	Diabète Modéré/Sévère	
Durant la gestation	1x15-65 mg/Kg	Intra péritonéale Intra veineuse	Rat	Diabète Modéré/Sévère	Altération métabolique néonatal et/ou à l'âge adulte

### 3b-Les modèles animaux de diabète de type 2

#### Les modèles génétiques : souris *ob / ob* et rats Zucker

Le rat Zucker (ou encore rat *fa/fa*) est une souche de rat qui développe dès la 4<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale une obésité spontanée et une hyperphagie. Le phénotype du rat Zucker est le résultat d'une mutation autosomale récessive du gène *Lep<sup>prfa</sup>* présent sur le chromosome 5 et qui code pour le récepteur de la leptine. En plus de l'obésité, le rat Zucker présente un syndrome métabolique défini par une dyslipidémie, une résistance à l'insuline, une intolérance partielle au glucose, et une hypertension légère. L'hyperphagie qui accompagne ces anomalies métaboliques est en rapport avec un défaut de signalisation du récepteur à la leptine au niveau de l'hypothalamus (Kasiske et al., 1992; White and Martin, 1997). Le rat Zucker représente un modèle d'obésité associé à un diabète de type 2 et est principalement utilisé pour élucider les mécanismes pathophysiologiques et thérapeutiques.

A partir de la souche Zucker obèse, une souche secondaire a pu être sélectionnée: il s'agit du rat Zucker obèse diabétique. Cette souche a été établie à partir d'une sélection consanguine de rats Zucker obèses et hyperglycémiques. Le rat Zucker diabétique est utilisé comme modèle d'étude des mécanismes du diabète de type 2. Contrairement au rat Zucker obèse, le rat Zucker diabétique évolue vers un diabète franc dû à une forte résistance à l'insuline. Dans cette souche, les mâles sont plus sujets à l'apparition du diabète qui se manifeste entre la 7<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> semaine après la naissance. Les femelles de la même portée sont obèses, résistantes à l'insuline mais ne développent pas le diabète et peuvent servir de témoins. L'hyperglycémie chez le mâle s'explique par une down-regulation de l'expression du transporteur de glucose Glut 2 et une diminution de la synthèse d'insuline au niveau de la cellule bêta. Le transport du glucose via la réduction du transporteur Glut 4, au niveau du tissu adipeux et des muscles squelettiques est également diminué. Le rat Zucker diabétique constitue un très bon modèle pour l'étude des mécanismes pathophysiologiques impliqués dans le diabète de type 2 (Henriksen et al., 2011).

La souris *ob/ob*, également appelé *Lep<sup>ob</sup>*, est une souche de souris C57BL/6J avec une récession allélique autosomique du gène situé au niveau du chromosome 6 et qui code pour la leptine. Les souris mutantes homozygotes sont hyperphagiques et présentent un gain de poids rapide qui peut être 3 fois supérieur à celui d'une souris normale. En plus de l'obésité, la

souris *ob/ob* est diabétique et présente une insulino-résistance sévère. La souche à fond génétique C57BL/6J présente une hyperglycémie transitoire (diminuant entre la 14<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> semaine), tandis que la souche à un fond génétique C57BL/KS est franchement diabétique du fait d'une destruction massive des îlots et est encline à des décès prématurés. L'hyperglycémie ne se développe qu'après l'augmentation de la masse corporelle. La résistance à l'insuline est associée à une surproduction hépatique de glucose, une augmentation de l'activité des enzymes de la néoglucogenèse, une diminution de l'activité de la synthèse de glycogène (Lindstrom, 2007).

### Les modèles animaux non génétiques

Il existe à l'heure actuelle peu de modèles standards reproduisant les désordres métaboliques que l'on rencontre au cours de la gestation, et qui s'apparentent à un diabète de type 2 ou à un diabète gestationnel. La manipulation du régime alimentaire de la mère fournit une méthode alternative pour induire un diabète de type 2 ou un GDM avec ou sans obésité.

Le modèle de diabète de type 2 chez la femelle gestante induit par un régime hypercalorique est décrit pour la première fois dans les années 80 (Surwit and Feinglos, 1988; Surwit et al., 1988). Des données de plus en plus croissantes sont obtenues chez le rat comme chez la souris et décrivent les conséquences d'une alimentation maternelle riche en graisses et/ou en sucres sur les troubles de la tolérance en glucose dans la descendance. Les régimes hyperlipidiques-hypercaloriques comportant 40-60% de graisses apportées sous formes d'acides gras saturés, sont largement utilisés chez les rongeurs pour induire chez la mère une obésité et des troubles du métabolisme énergétique.

Les études cliniques et les modèles animaux montrent que l'exposition *in utero* au diabète maternel constitue en soi un risque pour le développement du diabète dans la descendance pouvant conduire à la mise en place d'un cercle vicieux de transmission de la maladie sur plusieurs générations. Cette transmission maternelle ne se limite pas au cas des grossesses diabétiques (ie diabète de type 1 et diabète de type 2) ou à celui du diabète gestationnel. En effet, il est maintenant établi qu'un « stress maternel » d'origine nutritionnel expose l'individu au même risque.



## II Nutrition maternelle et programmation du diabète de type 2

### A) Données épidémiologiques

#### 1) Concept de programmation nutritionnelle : Hypothèse de Barker

En 1990, sous l'impulsion de Hales et Barker, naît le concept de programmation nutritionnelle ou empreinte métabolique, pour expliquer comment un environnement nutritionnel *in utero* inapproprié peut induire à long terme le développement de pathologies métaboliques dont le diabète (Barker, 1990). Ce concept d'empreinte métabolique suggère qu'une modification nutritionnelle qui survient au moment de la conception et/ou pendant les phases critiques du développement du fœtus ou du jeune enfant, perturbe le processus physiologique normal de développement des organes et leur fonctionnement métabolique. Ces modifications constituent une réponse adaptative vis-à-vis de « l'agression nutritionnelle » en assurant à court terme la survie de l'individu.

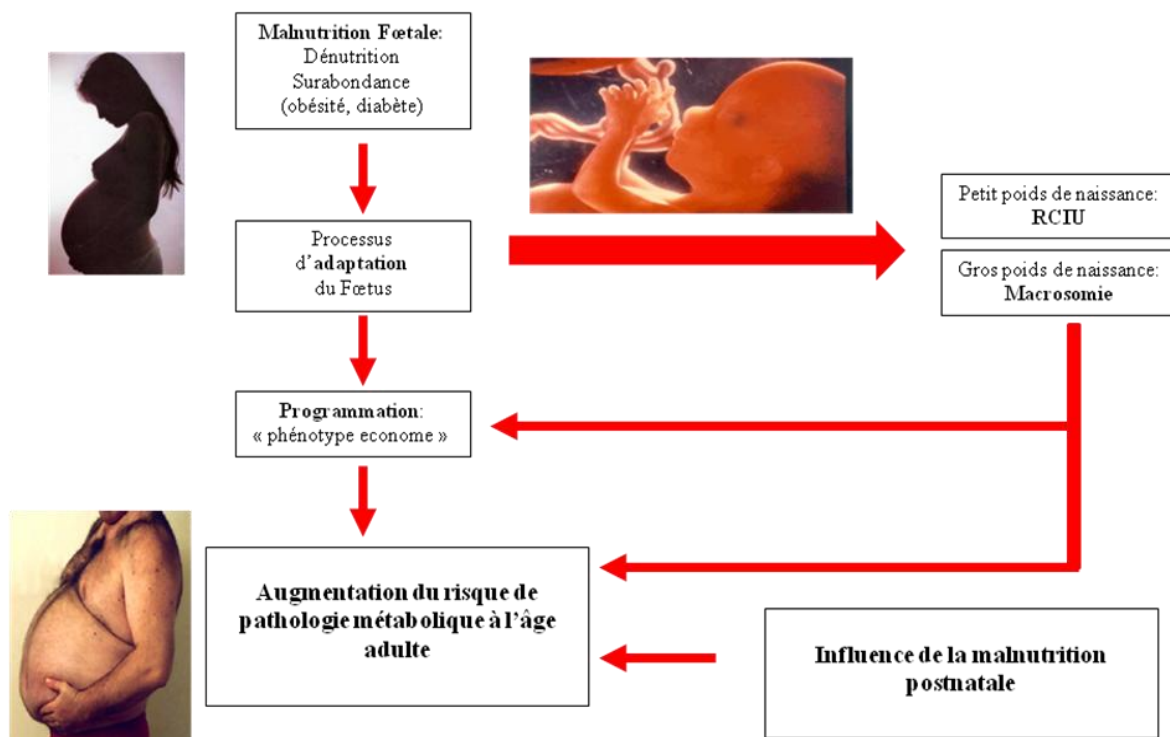
La première étude épidémiologique correspond à celle portant sur la grande famine qui a touché la population d'Amsterdam pendant la Seconde Guerre Mondiale. Le stress traumatique et nutritionnel auquel furent exposées les femmes enceintes a eu pour conséquences la naissance de nouveau-nés plus petits, et ce d'autant plus que les événements stressants avaient eu lieu en fin de grossesse. A l'âge adulte, la majorité d'entre eux souffraient d'intolérance au glucose et présentaient une résistance à l'insuline. Ces individus avaient également un profil lipidique athérogénique et un IMC augmenté, favorisant le risque de maladies cardiovasculaires. Ces résultats montraient pour la première fois que la dénutrition au cours de la grossesse pouvait avoir un impact sur le devenir métabolique de la personne et suggéraient l'existence de fenêtres de programmation correspondant aux stades critiques du développement. A long terme, ces modifications adaptatives créaient les conditions d'apparition de pathologies métaboliques si l'organisme se trouvait exposé à un environnement fondamentalement différent.

La croissance fœtale constitue donc un facteur déterminant de l'état de l'individu à l'âge adulte, l'exposant ou non à un risque élevé à développer un certain nombre de maladies métaboliques, dont le diabète de type 2.

Initialement, la théorie de Barker dite également théorie du « phénotype économe » a été fondée sur les études ayant trait à la dénutrition maternelle, mais cette notion est maintenant

élargie et s'applique également aux cas de malnutrition et/ou dysnutrition maternelle dont la surnutrition. Ces modifications (malnutrition et/ou dysnutrition) du régime alimentaire maternel sont également associées à l'apparition de troubles métaboliques chez la descendance à l'âge adulte (Figure 7). De plus, il est clairement établi que la fenêtre temporelle de programmation ne se limite pas à la période gestationnelle mais englobe la période postnatale, ce qui suggère l'importance de la lactation dans les processus de la programmation des maladies métaboliques.

**Figure 7 : Concept de programmation nutritionnelle**



## 2) Dysnutrition maternelle et programmation du diabète de type 2

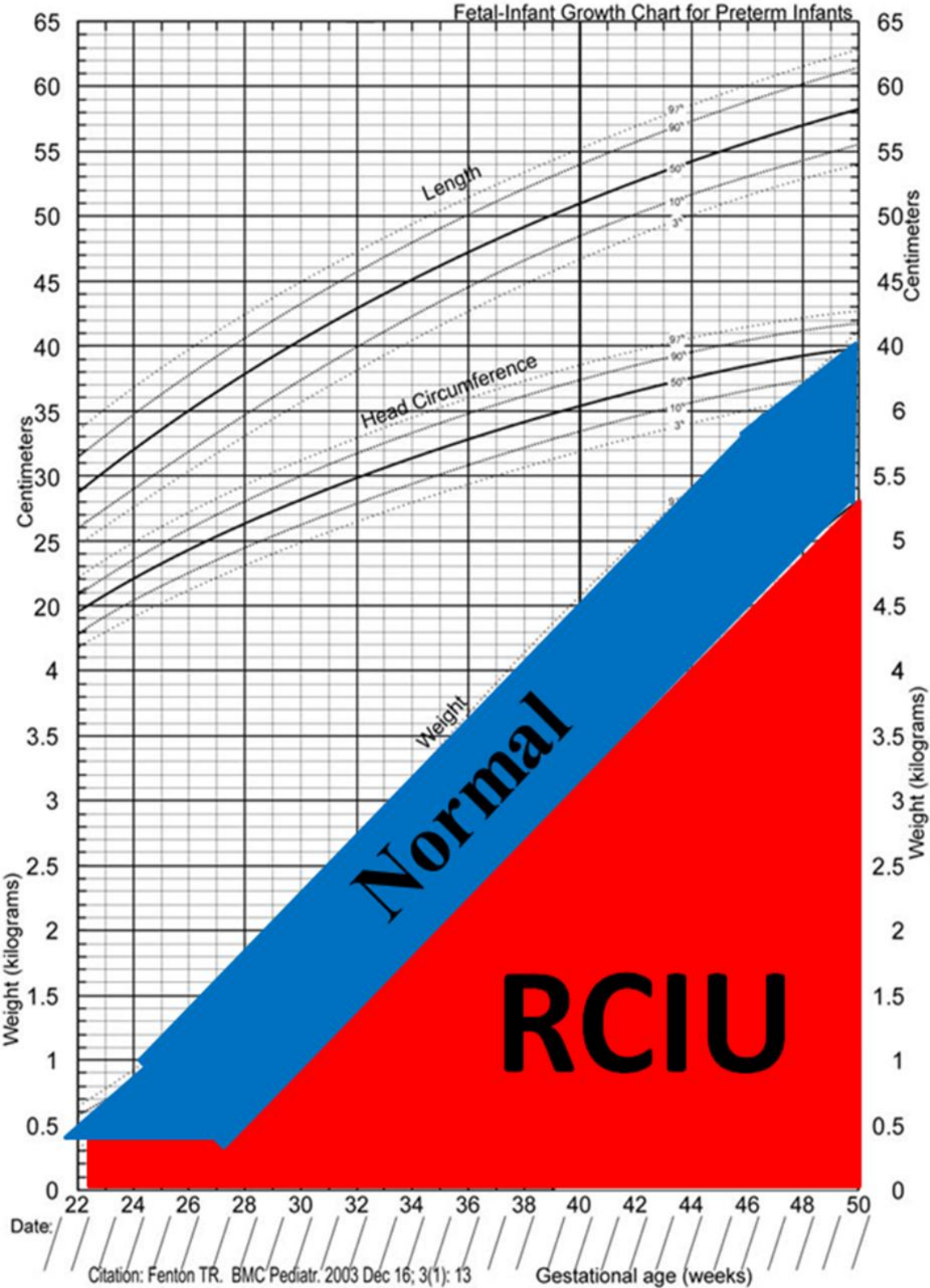
### 2a-La sous-nutrition maternelle

La malnutrition : La dénutrition et/ou la malnutrition maternelle touchent de nombreuses femmes à travers le monde. Près de 50% de la population mondiale vit dans un pays où le manque de nourriture se fait ressentir, et près de 800 millions de personnes sont touchées par la famine dont de nombreuses femmes enceintes (Figure 8). La malnutrition maternelle altère la croissance fœtale, on parle alors de retard de croissance intra utérin (ou RCIU), avec pour conséquences la naissance de nouveau-nés avec un faible poids. Lorsque la dénutrition se manifeste avant la 26<sup>ème</sup> semaine de gestation, le nouveau-né présente un RCIU harmonieux, alors qu'au-delà on observe plutôt un RCIU disharmonieux (Hendrix and Hasman, 2008).

Le retard de croissance intra utérin se définit par un poids inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile de la courbe pour l'âge gestationnel, et par une circonférence abdominale inférieure au 2,5<sup>ème</sup> percentile. A terme, le « cut off » du poids de naissance d'un RCIU est de 2,5 kg. La définition du RCIU est basée sur des courbes établies à partir des données recueillies sur des populations occidentales (Europe et Amérique du nord) avec 6 à 8% de nouveau-nés sous le seuil des 2,5 kg, et ne peut pas s'appliquer aux nouveau-nés des pays en voie de développement (Reagan and Salsberry, 2005).

A court terme, le RCIU s'accompagne de complications sévères avec un fort taux de mortalité et de morbidité, chez le fœtus. En effet, on constate que 52% des morts *in utero* non expliquées, sont associés à un RCIU (Froen et al., 2004). Dans les pays développés, le RCIU représente la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité périnatale avec 10% de décès, et vient juste après les pathologies liées aux malformations et la prématurité (Friedlander et al., 2003; McIntire et al., 1999; Richardus et al., 2003). Lors de l'accouchement, le nouveau-né RCIU est non seulement exposé au risque d'asphyxie mais également à de nombreuses autres complications comme la polyglobulie, l'hypocalcémie, l'hypoglycémie et l'hypothermie. A long terme, les enfants nés avec un petit poids de naissance sont plus vulnérables au développement de maladies métaboliques que les enfants normotrophes. (Hales et al., 1991; Kyle and Pichard, 2006; Wadsworth et al., 1985). Un RCIU à la naissance augmente d'un facteur 6 le risque de développer à l'âge adulte des anomalies du métabolisme glucidique, voire un diabète de type 2. La courbe de croissance des nouveau-nés RCIU en période postnatale est également déterminante dans le développement des maladies métaboliques.

Figure 8 : Courbe de croissance fœtale et limite d'inclusion du RCIU



En effet, un enfant présentant un RCIU et qui rattrape rapidement la courbe de croissance normale en période postnatale, traduisant ce qui est communément appelé « catch up » est plus enclin à présenter une obésité et un diabète qu'un enfant présentant un RCIU avec une courbe de croissance postnatale normale. Chez un enfant avec une croissance normale, la courbe de corpulence augmente de 0 à 1 an, diminue ensuite dans la petite enfance de 1 à 5 ans, et présente un rebond d'adiposité à 6 ans (Rolland-Cachera, 1984). Les enfants présentant un RCIU, ont un rebond d'adiposité qui intervient plus précocement dès l'âge de 3 ans (Rolland-Cachera, 1984). Cette avancée dans le temps du rebond adipocytaire se traduit chez l'adulte par une plus grande propension à développer une obésité. De même, lorsque cette période de rattrapage se fait très tôt dans la vie post natale, une dyslipidémie se développe à l'âge adulte (Sinclair et al., 2007), ce qui favorise l'apparition d'une hypertension et l'augmentation de la mortalité de maladies cardiovasculaires.

## 2b-Surabondance nutritionnelle et obésité maternelle

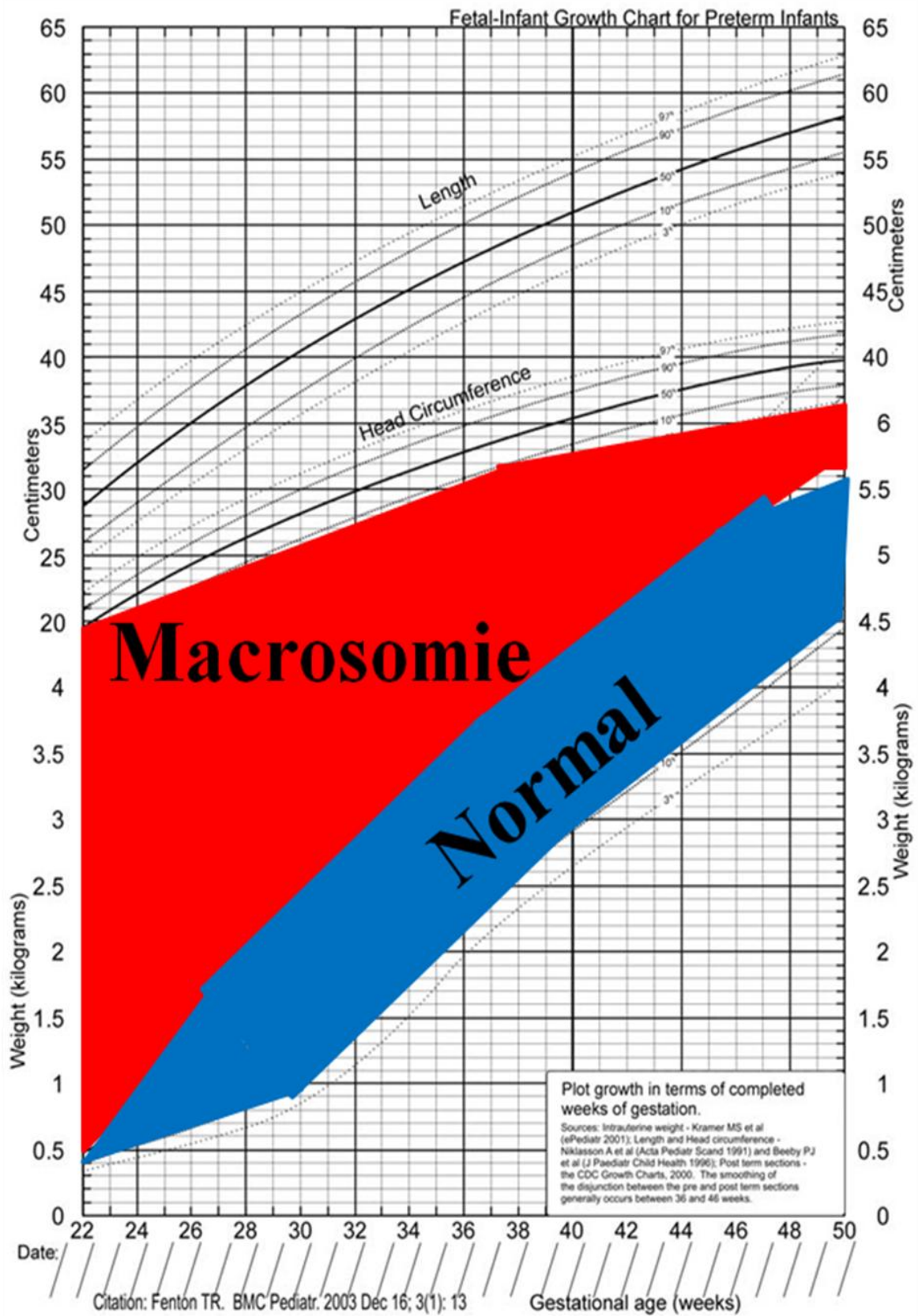
Une alimentation hypercalorique ou un régime riche en graisses, en cholestérol, ou en hydrates de carbone sont responsables le plus souvent d'une obésité maternelle et/ou un diabète de type 2, et exercent des effets délétères sur la croissance du fœtus. L'augmentation exponentielle de l'obésité et du diabète de type 2 chez des femmes en âge de procréer justifie que l'on s'intéresse aux conséquences de la surnutrition maternelle sur la santé de la descendance.

La macrosomie qui accompagne le plus souvent ces grossesses, est définie par un poids de naissance supérieur à 4 Kg ou un poids de naissance supérieur ou égale au 90<sup>e</sup> percentile de la courbe de croissance en tenant compte de l'âge gestationnel. Cependant dans certaines situations, en particulier dans les cas d'obésité maternelle morbide et de dyslipidémie majeure, les anomalies de la croissance fœtale se traduisent par un RCIU (Catalano et al., 2003). La macrosomie touche 15 à 30 % des grossesses compliquées par un diabète gestationnel et 13 % des grossesses associées à l'obésité maternelle (Nohr et al., 2005; Weiss et al., 2004a). Les complications de la macrosomie à la naissance sont assez sévères, aussi bien chez la mère que chez le fœtus. Les femmes accouchant de nouveau-nés macrosomes sont exposées à une augmentation des césariennes, et quand elles accouchent par voie basse elles sont sujettes à un plus grand nombre de déchirures périnéales, d'hémorragie lors de la délivrance, et d'infections post-partum. Le fœtus quant à lui est exposé à un risque de mort *in utero*, mais surtout à de nombreuses difficultés à l'accouchement dues à son poids élevé.

La surcharge pondérale ou l'obésité chez la mère mais également la prise de poids au cours de la grossesse, constitueraient des facteurs plus fortement associés à la macrosomie que les anomalies de la tolérance au glucose (Kabiru and Raynor, 2004). L'augmentation de la résistance à l'insuline chez les mères obèses en plus de favoriser la disponibilité en nutriments pour le fœtus en fin de gestation, affecte la fonction placentaire. C'est sans doute pour cette raison que les femmes obèses même avec une tolérance normale au glucose ont deux fois plus de risque de donner naissance à un enfant macrosome (Ehrenberg et al., 2004). Jensen et al ont menés une étude clinique en incluant des femmes qui étaient en surpoids ou obèses avant la grossesse et ont exclu de l'étude toutes celles qui déclenchaient un DG. Leurs résultats montrent une augmentation du taux de macrosomie chez les femmes en surpoids et les femmes obèses. Le nombre de femmes ayant un problème de poids durant la gestation est 10 fois plus élevé que les femmes déclenchant un DG. On peut donc mettre en parallèle l'augmentation de la prévalence de la macrosomie et l'augmentation de la prévalence de l'obésité. Des études épidémiologiques ont établi un lien direct entre le BMI de la mère durant la grossesse et la croissance fœtale, le BMI de la descendance, et l'obésité chez l'adulte (Salsberry and Reagan, 2005). De plus, les enfants exposés à une obésité maternelle ont un risque accru de développer un diabète de type 2. Des études ont également démontré que les femmes présentant un surpoids ou obèses à l'adolescence ont plus tendance à prendre du poids pendant la grossesse (Battista et al., 2011). Cette susceptibilité chez les mères à prendre davantage de poids au cours de la gestation peut conduire à la mise en place d'un cycle vicieux intergénérationnel.

On observe également que la prévalence de l'obésité est diminuée de moitié (52%) chez les enfants de mère obèse nés après la chirurgie bariatrique de celles-ci comparés à leurs frères et sœurs nés quand leur mère était obèse (Dalfra et al., 2012).

Figure 9 : Courbe de croissance fœtale et limite d'inclusion de la macrosomie



De nombreuses études longitudinales montrent que les enfants macrosomes ont un risque accru de développer des maladies métaboliques et ce dès la petite enfance. Sur un plan anthropomorphique, 50% des nouveau-nés macrosomes deviennent obèses à l'âge de 8 ans et le demeurent pour la moitié d'entre eux à 16 ans (Weiss et al., 2004b). De plus, les macrosomes nés de mères diabétiques et obèses ont un risque accru de présenter un syndrome métabolique à l'adolescence (Lapillonne et al., 1997; Lepercq et al., 2001). Les macrosomes nés de mère obèse ou en surpoids mais présentant une tolérance normale au glucose, présentent également des perturbations métaboliques lors de la petite enfance qui perdurent à l'âge adulte et conduisent à l'augmentation du pourcentage d'obèses dans cette population. L'hyperglycémie et l'obésité maternelles ne sont pas les seuls facteurs responsables de la macrosomie, les facteurs sociaux-culturels et ethniques constituent également des facteurs de risques potentiels.

## **B) Effets transgénérationnels d'une dysnutrition maternelle : ce qu'apportent les modèles animaux**

### **1) Modèles animaux de programmation nutritionnelle**

Dans la plupart des modèles animaux décrits à ce jour, les conséquences d'une malnutrition maternelle sur la descendance reflètent en général celles observées chez l'homme. Cependant, l'ampleur du phénotype, les mécanismes et les effets sexe-spécifiques dépendent du régime alimentaire de la mère et de l'espèce animale considérée. La fenêtre de programmation, c'est-à-dire la période d'exposition (gestation, lactation) est également un élément important dans l'apparition des phénotypes de la descendance. Enfin, il faut souligner que certains de ces phénotypes ne sont visibles que sur la première génération, tandis que d'autres sont transmis sur plusieurs générations (F2, F3) (Pongio et al., 2012).

#### **1a-Modèles animaux de dénutrition maternelle**

Les modèles de dénutrition maternelle obtenus par restriction calorique correspondent à une diminution globale de l'apport calorique maternel (40 à 70 % de la ration journalière) durant tout ou partie de la gestation. Dans tous les cas, la dénutrition maternelle induit chez le nouveau-né un RCIU, et programme des pathologies métaboliques à l'âge adulte. Une réduction de 50 % de l'apport alimentaire quotidien durant la dernière semaine de gestation



chez la ratte, a pour effet de diminuer la masse des cellules bêta pancréatiques chez le nouveau-né (Bertin et al., 2002; Even et al., 2003). Lorsque cette dénutrition est étendue à la période de la lactation, la réduction de la masse des cellules bêta pancréatiques est permanente, et une intolérance au glucose s'installe progressivement en fonction de l'âge de la descendance (Garofino et al 1999). Dans les modèles de restriction calorique de 70% durant toute la gestation, les rats ont un RCIU marqué à la naissance, et présentent à l'âge adulte une hyperphagie, une hyperinsulinémie, une hypertension et une hyperleptinémie associée à un phénotype d'obésité (Vickers et al., 2000). Quand la descendance est soumise à un régime hypercalorique dès le sevrage, le phénotype d'obésité est encore plus marqué (Bispham et al., 2005).

Le second modèle de dénutrition maternelle correspond à une diminution de l'apport protéique dans la ration alimentaire qui passe de 20% à 5 ou 8%, mais sans réduction de l'apport calorique total. Les modèles animaux dits «lowprotein », donnent naissance à des nouveau-nés de petits poids traduisant là encore un RCIU. A l'âge adulte, ces animaux sont également hypertendus. (Langley-Evans and Jackson, 1996a; Langley-Evans and Jackson, 1996b; Petry et al., 1997), et présentent une diminution de la tolérance au glucose et une sensibilité à l'insuline réduite, ces anomalies étant accentuées si les descendants sont exposés à un régime hyperlipidique (Stocker et al., 2004; Wilson and Hughes, 1997). L'impact de la restriction protéique maternelle sur la programmation métabolique se traduit par une réduction de la fonction du pancréas endocrine, et par des troubles de la fonction hépatique (Dumortier et al., 2007 ; Remacle et al., 2007).

### 1b -Modèles animaux de surnutrition maternelle

Lorsque les rattes gestantes sont soumises à un régime riche en graisses, les animaux à l'âge adulte ont des troubles du métabolisme lipidique et glucidique,et sont atteints d'hypertension (Srinivasan et al., 2005; Srinivasan et al., 2006). Un régime riche en graisses durant la gestation et la lactation mais sans obésité apparente chez la mère suffit à la programmation du diabète et de l'obésité dans la descendance (Biddinger et al., 2005; Buckley et al., 2005a ; Buckley et al., 2005b).

Les modèles de rattes gestantes obèses ont également été développés pour comprendre la relation entre macrosomie à la naissance et apparition du diabète et de l'obésité à l'âge adulte. Les animaux nés de mère obèse ont une adiposité marquée associée à un comportement hyperphagique et une résistance à l'insuline (Samuelsson et al., 2008).

La croissance chez les rongeurs ainsi que la maturation de nombreux organes se poursuivent pendant les 3 premières semaines de vie postnatale qui correspondent à la lactation. Le nombre de petits dans la portée constitue donc un élément important pour la croissance extra utérine. Ainsi, le fait de moduler le nombre de nouveau-nés dans la portée influencera l'apport nutritionnel pour la progéniture. La réduction du nombre de petits durant la période de lactation (Plagemann et al., 1992) a pour conséquences une surnutrition post natale, qui entraîne à l'âge adulte une augmentation de la masse pondérale et une adiposité plus prononcée (Aubert et al., 1980 ; Bieswal et al., 2006 ; Bol et al., 2009).

Les modèles animaux ont permis de mettre en évidence l'importance de la nutrition maternelle périnatale sur la croissance fœtale et l'apparition de maladies métaboliques dans la descendance. Ils montrent également que des phénotypes opposés RCIU/ Macrosomie conduisent aux mêmes pathologies à l'âge adulte. Comme chez l'Homme, il existe dans ces modèles animaux une fenêtre de programmation qui détermine fortement la survenue de tels phénotypes.

## 2) Dimorphisme sexuel et programmation des maladies métaboliques

Les effets de la nutrition maternelle sur l'état de santé de la descendance montrent par ailleurs, que les hommes et les femmes ne développent pas les mêmes pathologies. De la même manière, le caractère sexe-dépendant de la transmission de ces phénotypes est observé dans les modèles animaux. La dénutrition calorique chez la souris au cours de la gestation, induit des troubles métaboliques dans la seconde génération qui s'avèrent être dépendants du sexe (Wu and Suzuki, 2006). Les mâles de la génération F1 issus de mères dénutries transmettent à la génération F2 un faible poids corporel, tandis que les femelles de la génération F1 issues de mères dénutries transmettent à la génération F2 une obésité (Jimenez-Chillaron et al., 2009). De même, chez la souris soumise à un régime hyperlipidique, l'insulinorésistance qui se développe chez la descendance est plus marquée chez le mâle que chez la femelle (Garg et al., 2011).

Chez le rat, la dénutrition protéique transmet à la descendance mâle et femelle de la seconde génération des traits phénotypiques différents qui dépendent de la période au cours de laquelle la mère est exposée au régime (Howie et al., 2012). En effet, chez la ratte soumise à un régime « lowprotein », seuls les mâles de la seconde génération ont une augmentation

significative de leurs poids corporel tandis que les deux sexes présentent des troubles métaboliques (Dunn et al., 2011). Une restriction calorique modérée durant la gestation chez le rat entraîne dans la descendance une hypertension dont la sévérité et la survenue dépend du sexe ; les mâles développant une hypertension plus précocement et de plus grande intensité que les femelles. En revanche si la restriction calorique a lieu durant la période de préimplantation, une augmentation de la pression sanguine est observée uniquement dans la descendance mâle (Hoppe et al., 2007 ; Elmes et al., 2009).

L'ensemble de ces données qui portent sur les effets dimorphiques de la programmation nutritionnelle, montre que les embryons mâles ont une réponse adaptative aux modifications de l'environnement intra utérin plus prononcée que celle des femelles, puisqu'ils sont plus touchés par des maladies métaboliques à l'âge adulte.

### 3-Les mécanismes épigénétiques de la programmation nutritionnelle

L'ensemble des données cliniques et expérimentales montre que l'exposition *in utero* à des conditions nutritionnelles délétères n'affecte pas uniquement les descendants de la première génération mais peut également toucher les générations suivantes, même si celles-ci évoluent dans un environnement harmonieux. Les études épidémiologiques réalisées sur les descendants des femmes touchées par la famine d'Amsterdam, ont notamment démontré qu'il y avait des répercussions à long terme non seulement sur la santé de leurs enfants, mais également sur celle de leurs petits-enfants. La British National Child Development Study a également montré que la dénutrition maternelle programme le poids de naissance des descendants de la troisième génération.

De la même manière, les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2 peuvent être transmis aux petits-enfants dont les grands-parents ont été exposés à une dénutrition pendant leur enfance (Poston, 2011). Cette étude a par ailleurs démontré que la transmission à travers les générations s'effectuerait *via* la lignée paternelle. La transmission à la 3<sup>e</sup> génération pourrait venir d'une exposition des cellules germinales de la F1, qui aurait donc des répercussions sur plusieurs générations du fait des mécanismes épigénétiques.

En 1974, Conrad Hal Waddington fut le premier à prononcer le terme « épigénétique », qu'il définit comme étant l'interaction entre un organisme et son environnement aboutissant à un phénotype particulier (Waddington, 1974). A l'heure actuelle, l'épigénétique englobe l'ensemble des modifications de l'ADN et/ou des histones qui ne

touchent pas à 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. Ainsi, une méthylation au sein d'îlots CpG, va limiter l'accessibilité à l'ADN et diminuer l'expression du gène cible (Sulewska et al., 2007). Ces phénomènes de méthylation sont conservés lors de la réplication de l'ADN par l'action des DNA méthyltransférases (DNMTs) assurant ainsi la pérennité des modifications épigénétiques (Waterland and Garza, 1999). Des travaux récents et de plus en plus croissants suggèrent que ces modifications épigénétiques sont à la base des processus physiopathologiques résultant de la programmation périnatale. A ce titre, Bogdarina *et al* ont mis en évidence dans un modèle de restriction protéique chez le rat, une diminution de la méthylation du gène codant le récepteur à l'angiotensine de type 1b (AT1b) au niveau des glandes surrénales (Bogdarina et al., 2004). Cette hypométhylation s'accompagne d'une augmentation de l'expression du récepteur AT1b, et pourrait contribuer au phénotype d'hypertension retrouvé chez les descendants dans ce modèle (Plagemann et al., 2009). De plus, la restriction protéique pendant la gestation modifie le degré de méthylation des îlots CpG situés au niveau des promoteurs des gènes codant pour PPAR $\alpha$  et pour le récepteur aux glucocorticoïdes de type II (ou GR) dans le foie des descendants issus de la première génération (F1) mais aussi dans celui des descendants de la seconde génération (F2) (Burdge et al., 2007).

### **III Rôle du placenta dans la programmation fœtale**

#### **A) Placenta et croissance fœtale**

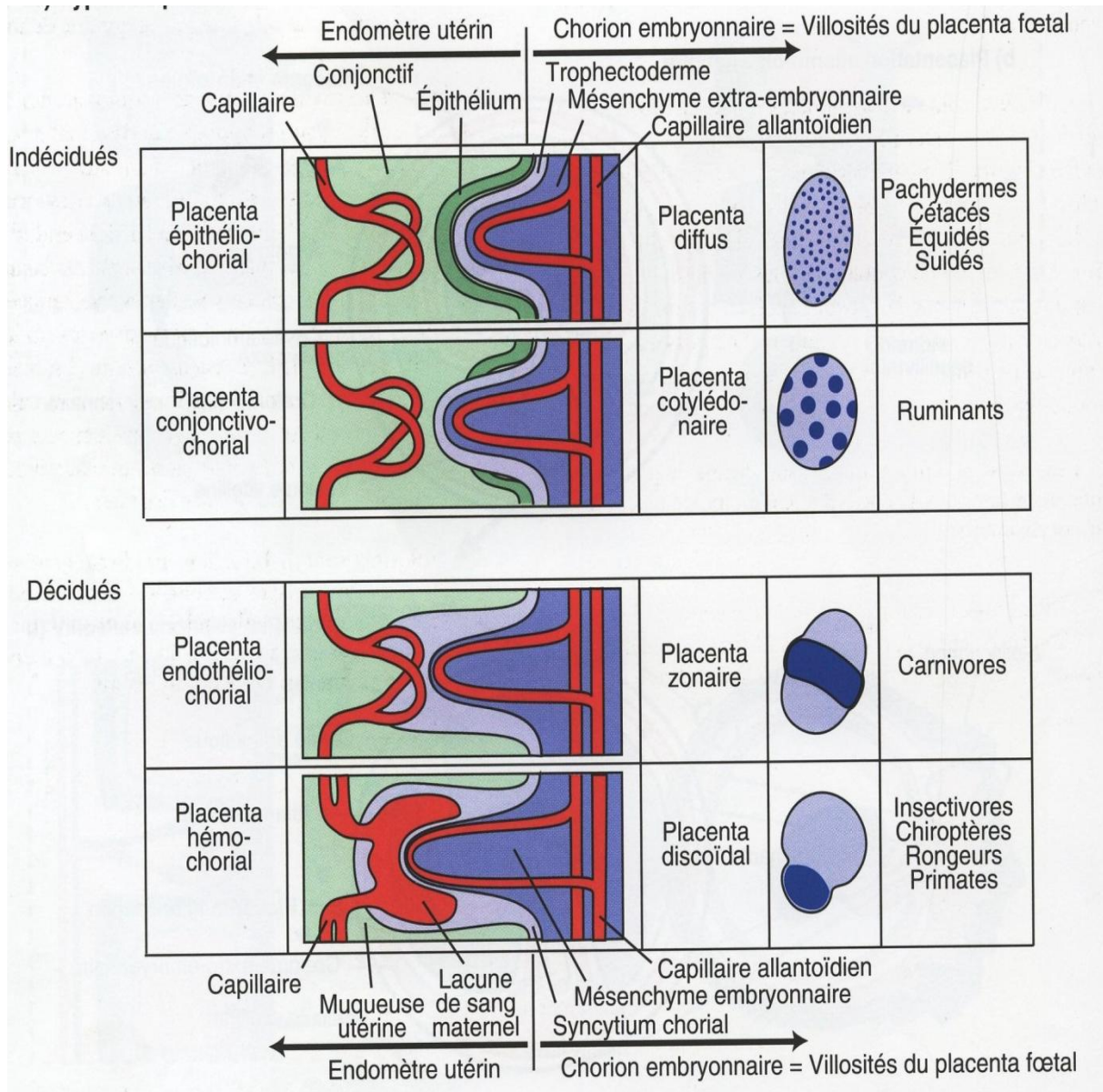
##### 1) Les différents placentas

La croissance fœtale est principalement déterminée par la disponibilité en nutriments, laquelle est directement liée au transfert transplacentaire. Des études récentes montrent que le placenta n'est pas juste un organe passif permettant les échanges fœto-maternels, il est capable d'adapter sa capacité à transférer les nutriments en réponse aux modifications de l'environnement intra utérin.

Le placenta est un organe transitoire présent uniquement chez les mammifères euthériens. Il constitue l'interface active entre les circulations sanguines maternelle et fœtale en servant d'une part de barrière immunologique et en permettant d'autre part l'acheminement des nutriments et de l'oxygène pour le développement du fœtus. On distingue deux types de placentation dite déciduée ou indécidué selon le degré d'invasion et de pénétration du chorion embryonnaire dans la muqueuse utérine, responsables respectivement au moment de la parturition d'un processus d'hémorragie ou non. La classification des placentas se fait également en fonction du nombre de couches tissulaires séparant les systèmes vasculaires maternels et fœtaux, et de la forme et de la distribution des sites de contact entre les membranes fœtales et l'endomètre maternel. La placentation indécidué permet la formation d'un placenta épithélio-chorial ou conjonctivo-chorial tandis que la placentation déciduée sera à l'origine de la formation d'un placenta hémochorial (Figure 10).

Une caractéristique majeure de la placentation hémochoriale est le remodelage vasculaire extensif des artères spiralées maternelles qui facilite le flux de nutriments et les échanges gazeux. Cette spécialisation utéro placentaire est utilisée par plusieurs espèces, parmi lesquelles on trouve les primates, les rongeurs et les lagomorphes.

**Figure 10 : Classification des différents types de placenta.**



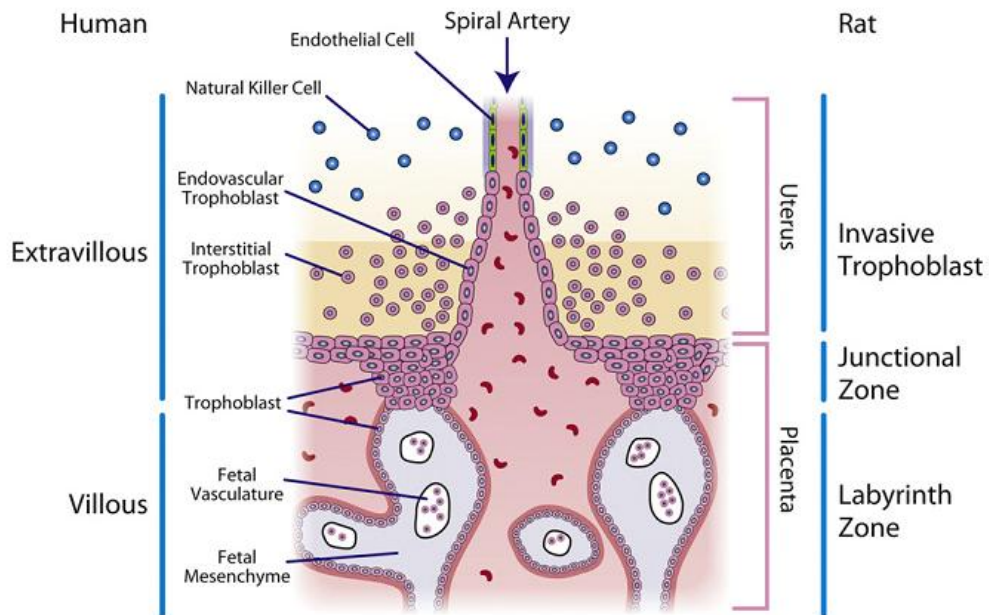
Tiré de R. Franquinet, Foucrier ; Embryologie descriptive ; 157p ; DUNOD, 2<sup>e</sup> édition ; 2003 .

## 2) Développement du placenta hémochorial chez le rat

Chez les rongeurs comme chez les primates, le placenta est de forme discoïde et de type hémochorial, ce qui signifie que le trophoblaste établit un contact direct avec le sang maternel. Contrairement à la souris qui présente une placentation superficielle, la placentation hémochoriale chez le rat montre de grandes similitudes avec celle observée chez l'Homme. En particulier en ce qui concerne l'invasion trophoblastique intra-utérine et le remodelage des artères spiralées. La succession des événements clés est similaire dans les 2 espèces mais sur une durée très différente : 9 mois chez l'Homme contre 21 jours pour le rat. Cependant, il existe des différences structurales, en particulier dans le nombre de couches trophoblastiques qui séparent l'endothélium maternel de l'endothélium fœtal : monochorial chez l'Homme, trichorial chez le rat, et dans la présence de villosités trophoblastiques dans le placenta humain (Malassine et al., 2003).

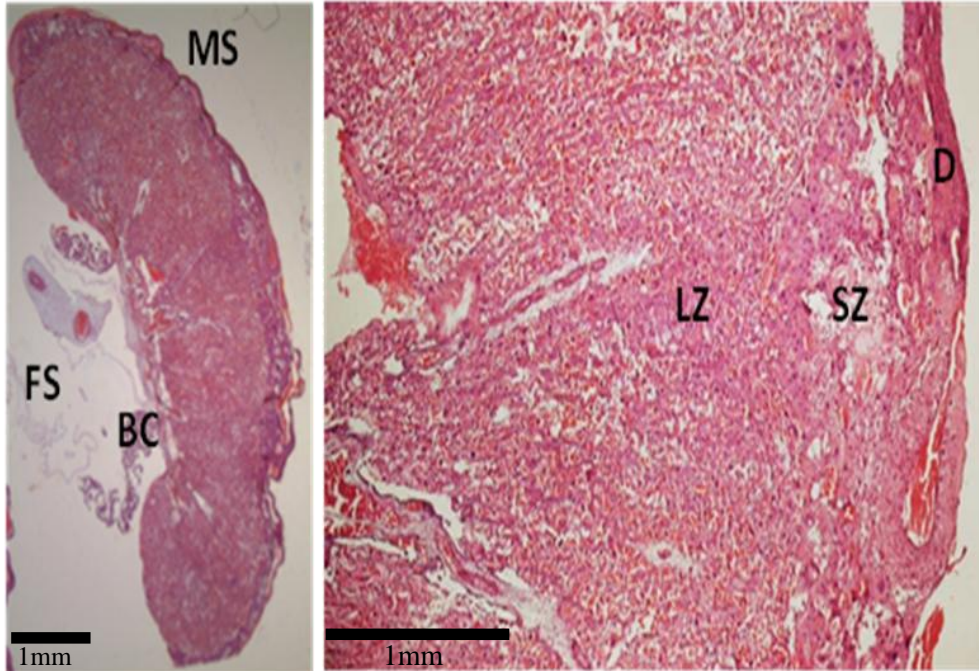
Chez le rat, le placenta est divisé en deux zones bien distinctes ayant toutes deux des fonctions bien définies ; la zone jonctionnelle localisée du côté maternel et la zone labyrinthique localisée du côté fœtal. Le labyrinthe est constitué par un réseau de vaisseaux sanguins maternels et fœtaux qui est séparé par les 2 couches de cellules (I et II) du syncytiotrophoblaste spécialisées dans le transfert de nutriments et les échanges transplacentaires. La zone jonctionnelle est subdivisée en deux parties : le spongiotrophoblaste, composé de larges cellules trophoblastiques et des cellules à glycogène, et la décidue qui renferme des cellules géantes. La zone jonctionnelle est impliquée dans les fonctions endocrines et invasives du placenta indispensables à son implantation et à sa croissance (Pijnenborg and Vercruysse, 2006). Les cellules géantes trophoblastiques localisées à l'interface materno-placentaire jouent un rôle important dans la fonction endocrine du placenta en synthétisant et sécrétant des hormones de la famille de la prolactine et des cytokines. Enfin, les cellules à glycogène dont les fonctions cellulaires n'ont pas clairement été identifiées, sembleraient impliquées dans le métabolisme du glycogène (Vercruysse et al., 2006).

**Figure 11 : Comparaison des sites de placentation hémochoriale entre l'Homme et le rat**



Tiré de Soares MJ Placenta 2012

**Figure 12 : Histologie du placenta de rat**

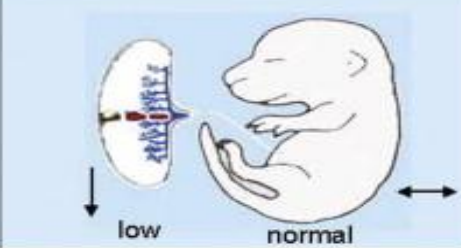
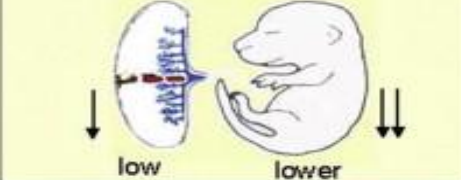
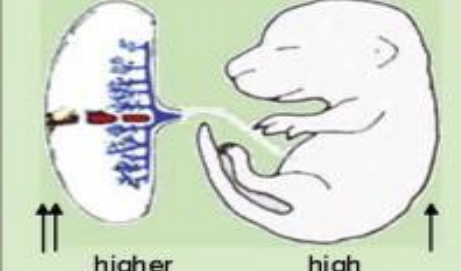


Légende—MS:cotématernel,FS:cotéfœtal,BC:cordonombilical,LZ:zonelabyrinthique, SZ : zone du spongiotrophoblaste, D : Décidue. Coloration : hémalun éosine safran à partir de placentas inclus en paraffine



L'insuline favorise la croissance du fœtus en agissant comme un signal de disponibilité en nutriments. En effet, la pancréatectomie chez le fœtus entraîne un RCIU (Fowden, 1995; Fowden and Comline, 1984; Fowden et al., 1984). L'insuline agit comme un promoteur de la croissance fœtale de par son action sur le métabolisme. Ainsi, la perfusion d'insuline chez le fœtus se traduit par une augmentation de sa captation de glucose associée à une augmentation de la prolifération cellulaire (Fowden and Silver, 1995). La concentration d'insuline fœtale à terme est positivement corrélée avec la glycémie et le poids de naissance du fœtus (Fowden and Silver, 1995). L'action positive de l'insuline sur la croissance nécessite l'intervention de facteur de croissance hépatique : les *insulin-like growth factors* (IGF). Les IGF sont connus pour stimuler la croissance fœtale. Des souris déficientes en IGF-I ou en IGF-II ont un poids de naissance à terme fortement réduit (Baker et al., 1993; DeChiara et al., 1990). La délétion du récepteur IGF de type 1, responsable de l'action d'IGF-I et d'IGF-II, cause un retard de croissance fœtal encore plus important (Liu et al., 1993).

**Figure 13- Conséquences phénotypiques de la délétion génique de l'IGF**

Model	Mismatch between placental supply and fetal demand levels	Functional adaptive responses
<i>Igf2P0<sup>+/-</sup></i>		Amino acid transport Glucose transport Calcium transport ↑
<i>Igf2<sup>-/-</sup></i>		Amino acid transport ↓
<i>H19<sup>Δ13-/+</sup></i>		Amino acid transport Glucose transport ↓

Des études menées chez différentes espèces ont montré une relation entre la concentration plasmatique fœtale d'IGF-I et le poids de naissance. Cependant, aucune corrélation n'a été

trouvée avec l'IGF-II(Klauwer et al., 1997). IGF-I semble avoir un rôle direct sur la prolifération des cellules fœtales, tandis qu'IGF-II va influencer le développement placentaire. L'importance de l'IGF-II dans le contrôle de la croissance placentaire est confirmée par la réduction de près de 40% de la masse placentaire associée à un retard de croissance intra-utérin chez les souris présentant une invalidation nulle du gène IGF-II P0 exprimé spécifiquement dans le placenta (Constância et al., 2002 ; Sibley et al., 2004).

### 3) Transport placentaire

La fonction principale et fondamentale du placenta est d'assurer le transfert d'oxygène et des nutriments de la mère au fœtus pour la croissance de celui-ci.

#### 3a-Transport d'O<sub>2</sub>

La fonction respiratoire du placenta permet l'apport d'oxygène au fœtus et l'évacuation du dioxyde de carbone fœtal. Ce transfert s'effectue au niveau de la zone labyrinthique chez le rat avec l'artère centrale utérine et les veines ombilicales. Le transport de l'oxygène se fait par diffusion passive (Georgiades et al., 2002).

#### 3b-Transport de nutriments

##### Transport de glucose

En raison de la forte demande en glucose du fœtus qui est d'environ 4-8 mg/kg/min (Aldoretta and Hay, 1995; Hay, 1995), une diffusion passive du glucose au travers du placenta serait inadaptée aux besoins fœtaux. Il existe donc un mécanisme spécifique pour faciliter le transfert du glucose à travers le placenta. Les transporteurs de glucose font partie de la famille des GLUT, qui compte à l'heure actuelle chez les mammifères 12 isoformes dont certaines sont des tissus spécifiques. Ces isoformes présentent des affinités différentes pour le glucose, et sont régulées soit par la concentration plasmatique de glucose soit par l'insuline. Trois isoformes ont été identifiées dans les placentas de rat et humain, il s'agit des isoformes GLUT1, GLUT3, et GLUT4.

GLUT1 est un transporteur de 55 KD dont l'expression est ubiquiste mais représente l'isoforme majeure du placenta permettant l'entrée de glucose disponible de la circulation sanguine de la mère vers celle du fœtus. Dans le placenta humain, GLUT 1 est exprimé du côté apical et basal des microvillosités, avec cependant une concentration 20 fois plus importante au niveau apical que basal. La localisation du transporteur GLUT 1, permet donc

un transport bidirectionnel du glucose de la mère vers le fœtus et du fœtus vers la mère, avec toutefois un sens materno-fœtal qui est privilégié en raison de la concentration massive de GLUT1 du côté apical. Dans le placenta de rat, GLUT1 est fortement exprimé au niveau de la zone de jonction et du labyrinthe. Le transporteur GLUT 1 dans la zone jonctionnelle semble être impliqué davantage dans la croissance du placenta que dans l'approvisionnement en glucose du fœtus, car son expression augmente significativement durant la croissance exponentielle du placenta c'est-à-dire pendant la première moitié de la gestation (Takata and Hirano, 1997). Au niveau du labyrinthe, le transporteur GLUT1 est exprimé du côté maternel et fœtal, assurant ainsi la fonction de nutrition fœtale (Takata and Hirano, 1997).

GLUT3 est une protéine de 42 Kd également ubiquiste, mais présente majoritairement au niveau du cerveau. Bien que cette isoforme soit exprimée dans le placenta, son rôle n'est pas clairement établi (Shin et al., 1997). Chez l'Homme, le profil d'expression du transporteur GLUT3 est différent de celui du transporteur GLUT1. En effet, l'ARN de GLUT3 est abondamment exprimé au niveau du syncytiotrophoblaste, alors que l'expression de la protéine est très faible. Cette dichotomie explique que le transporteur GLUT3 ne soit pas considéré comme un acteur majeur de la diffusion facilitée de glucose dans le placenta contrairement au transporteur GLUT1. Chez le rat, le transporteur GLUT3 est fortement exprimé au niveau de la zone labyrinthique et plus précisément au niveau de la partie apicale, et son expression augmente tout au long de la gestation (Shin et al., 1997).

Hormis le fait que leur répartition au sein du placenta soit différente, les 2 transporteurs se caractérisent par leurs affinités vis-à-vis du glucose, ou Km différents. En effet, le Km qui correspond au GLUT1 est plus élevé que celui du GLUT3 ce qui leur confère des rôles distincts au niveau du placenta chez le rongeur. L'une des fonctions principales de GLUT3 serait de protéger le fœtus des hyper et hypoglycémie maternelles (Shin et al., 1997).

### **Transport des acides aminés**

Le transport des acides aminés au travers du placenta est assuré par 9 systèmes différents, localisés chez l'homme au niveau apical des membranes villositaires et chez le rat au niveau de la zone du labyrinthe. Les transporteurs sont classés en fonction de la charge des acides aminés (cation, neutre, anion) et de leur dépendance ou non vis-à-vis du sodium. Tous

les transporteurs d'acides aminés présentent une augmentation de leur capacité de transport à l'approche du terme de la gestation chez l'Homme comme chez le rat.

Le système A est exprimé de manière ubiquiste dans les cellules de mammifères et constitue le représentant majeur des systèmes de transport des acides aminés dans le placenta (Jones et al., 2007). Au niveau du placenta, 3 isoformes appartenant au système A sont exprimées SNAT1, SNAT2 et SNAT4. Chez l'Homme et chez les rongeurs, ces transporteurs sont régulés par de nombreux facteurs tels que les nutriments, les changements d'osmolarité, les facteurs de croissance (IGF1, IGF2) et les hormones (insuline, leptine)(Jones et al., 2007). Lorsque des fragments villositaires humains sont incubés en présence de doses élevées d'insuline ou de leptine, on observe une up regulation de ces des transporteurs (Jansson et al., 2003a; Jansson et al., 2003b). Des études *in vitro* menées chez le rat ont également apporté une régulation de l'activité du système A placentaire par les IGF.

### **Transport des lipides**

Le transfert des lipides vers le fœtus à travers le placenta requiert un transport actif des FFAs (Free Fatty Acid, acides gras libres) par l'intermédiaire de fatty-acidbinding proteins (FABP)(Haggarty, 2002). Les FFAs proviennent soit des FFAs liés à l'albumine, soit des triglycérides ou des phospholipides associés aux lipoprotéines chylomicrons, VLDL. Dans le sang maternel, les FFAs liés à l'albumine sont probablement directement transférés par les protéines qui lient les acides gras. Les FFAs issus des lipoprotéines nécessitent l'action de lipase. La lipoprotéine lipase (LPL) et la lipase endothéliale sont fortement exprimées dans le placenta et assurent l'hydrolyse des triglycérides et des phospholipides (Lindegaard et al., 2006).

## **B) Altérations placentaires et programmation fœtale**

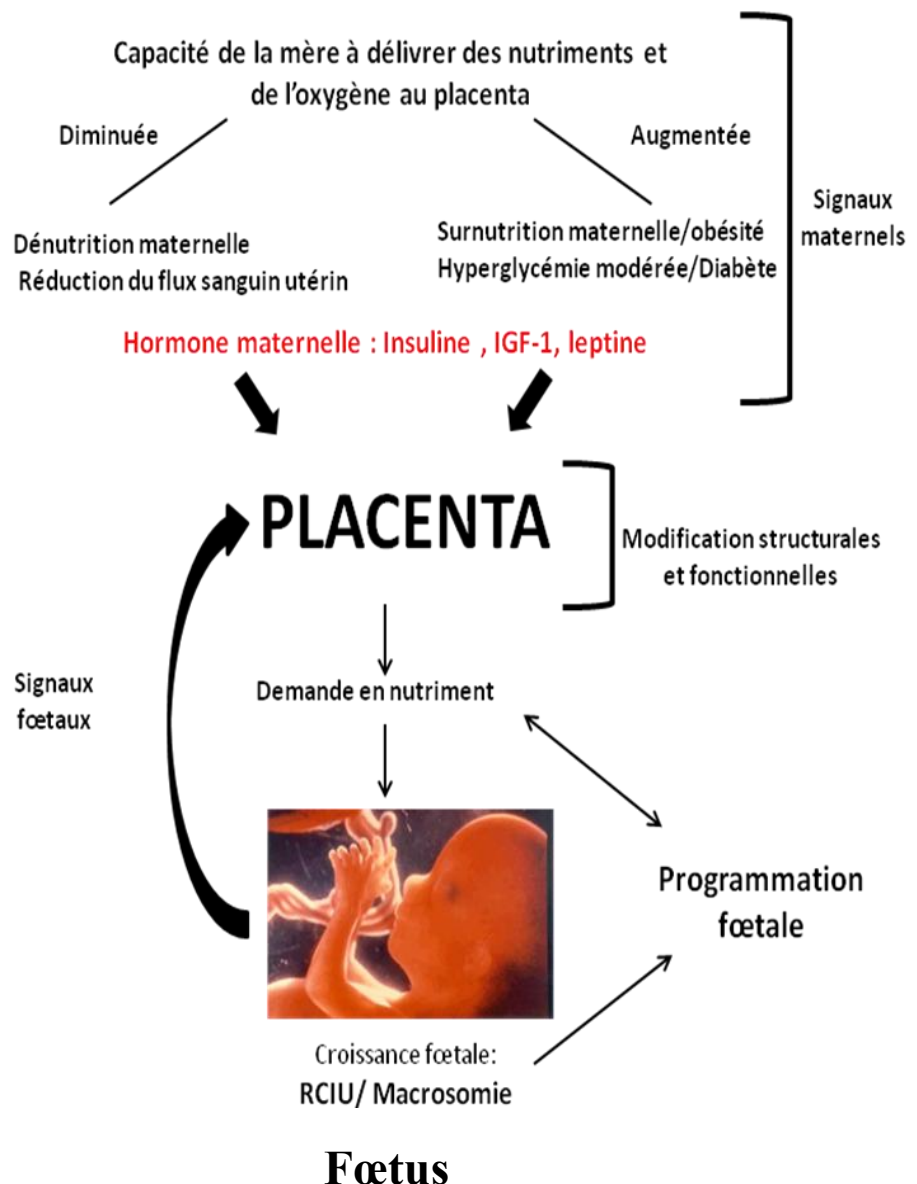
### 1) La notion de « cross talk » placentaire

Au travers des différents éléments décrits ci-dessus et qui composent l'unité placentaire, la notion de « cross talk » c'est-à-dire de dialogue croisé materno-foeto-placentaire prend tout son sens. Le placenta est au centre de ce dialogue du fait de sa structure à la fois embryonnaire et maternelle, et de ses fonctions nutritive et endocrine. Ainsi, l'état

physiologique de la mère peut avoir des répercussions directes et indirectes sur le fœtus via la fonction placentaire. Réciproquement, le placenta peut être sensible aux modifications hormonales et métaboliques du milieu utérin et aux signaux d'origine fœtale et par conséquent s'adapter à ces conditions intra-utérines et influencer la croissance fœtale (figure 14). De nombreuses études chez l'Homme et chez l'animal se sont focalisées sur les modifications placentaires et les répercussions éventuelles qu'elles peuvent avoir sur le développement du fœtus dans un contexte de programmation.

**Figure 14-Cross talk de l'unité materno-fœto-placentaire**

## Mère

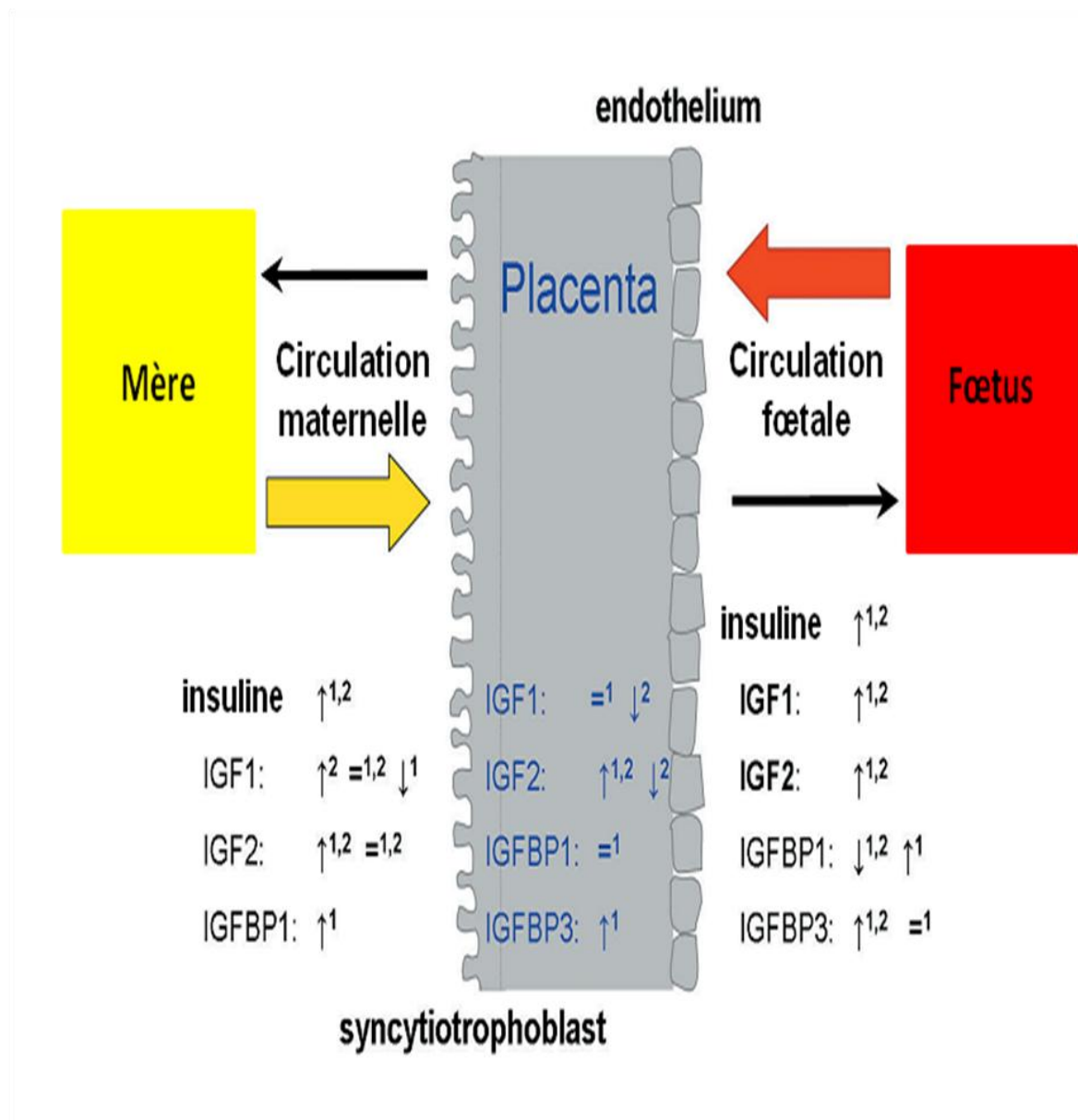


## 2) Altérations placentaires et grossesses diabétiques

Lors d'une exposition intra utérine à l'hyperglycémie maternelle, on observe une modulation de l'expression des transporteurs de nutriments. Dans le cas des grossesses diabétiques, l'expression des GLUTs est augmentée, entraînant un apport plus important de glucose au fœtus. Dans les modèles de rats diabétiques induits par la streptozotocine, le taux des ARNm du GLUT 3 est 3 à 4 fois plus important dans les placentas diabétiques, alors que l'expression du GLUT 1 n'est pas modifiée. De tels résultats confortent l'importance du transporteur GLUT3 dans le transfert du glucose et dans les mécanismes de protection du fœtus vis-à-vis de l'hyper ou l'hypoglycémie chez le rat (Haggarty et al., 2002). Les transporteurs de glucose ne sont pas les seuls à être modulés.

Une dysrégulation du système insuline/IGF peut avoir de profonds effets sur le placenta et par conséquent sur le développement du fœtus. Lors d'une grossesse diabétique (DT1, DG), l'hypo insulinémie maternelle va entraîner une hyper activation de l'axe insuline/IGF (Hiden et al., 2009a). Les taux maternels circulants d'insuline, d'IGF 1, IGF 2, et de certaines IGFBP sont augmentés. Au niveau placentaire comme chez le fœtus, l'expression de l'insuline et des IGFs est up régulée. (Hiden et al., 2009b).

**Figure 15—Altérations placentaires de l'axe insuline/Insulin-likegrowth factor dans les grossesses diabétiques.**



1 : Diabète de type 1, 2 : diabète gestationnel, ↑ : augmentation, ↓ : diminution, = : pas de changement.  
(D'après Hiden et al 2009)

### 3) Altérations placentaires et nutrition maternelle

#### 3a-Dénutrition maternelle

La dénutrition maternelle affecte la structure et le développement du placenta chez l'érat en ce sens qu'elle induit une réduction de la taille de la zone de jonction et du labyrinthe par apoptose des cellules trophoblastiques (Belkacemi et al., 2009). La restriction protéique induit quant à elle une expansion de la zone de jonction, une diminution de la zone labyrinthique et une augmentation de la surface du trophoblaste (Doherty et al., 2003). En cas de dénutrition maternelle par restriction alimentaire ou par régime low protein, on observe également une diminution de l'activité des transporteurs du système A. L'expression des transporteurs SNAT1 et SNAT2 est fortement diminuée respectivement au niveau des cellules géantes et dans la zone du labyrinthe et précède l'apparition du RCIU (Doherty et al., 2003).

#### 3b Obésité maternelle

Très peu de données décrivent la relation entre le poids de la mère et la taille du placenta. Le ratio poids du fœtus sur poids du placenta est largement utilisé comme marqueur de l'efficacité du transport placentaire (Allen et al., 2002). Chez l'homme, un surpoids ou une obésité maternelle sont associés à une augmentation de la taille, de la surface ou du poids du placenta (Wallace et al., 2012). Chez le rat, un régime alimentaire hyperlipidique obésogène est associé à une augmentation de la taille du placenta, en relation avec une hypertrophie de la zone jonctionnelle et du labyrinthe. D'autres études montrent au contraire une diminution de la zone jonctionnelle mais pas d'altération au niveau du labyrinthe (Mark et al 2011).

Les modifications métaboliques (ie concentrations plasmatiques des lipides et du glucose) et hormonales (insuline, IGF2, leptine), qui accompagnent l'obésité maternelle semblent être impliquées dans les anomalies structurales du placenta.



La nutrition maternelle, et les modifications homéostatiques qu'elle engendre perturbent la structure et les fonctions du placenta et bouleversent le développement fœtal. Le placenta a longtemps été considéré comme un organe asexué, et de ce fait la plupart des études ont poolé les résultats des placentas mâles et femelles dans un même groupe. Or nous savons maintenant que le placenta, comme d'autres organes, présente un dimorphisme sexuel.

## **C) Dimorphisme sexuel du placenta**

### **1-Origine précoce du dimorphisme sexuel**

L'hypothèse d'un dimorphisme sexuel du placenta repose sur les observations que la prédisposition métabolique à certaines maladies diffère selon le sexe. En effet, les femmes sont plus nombreuses à développer une obésité, tandis que les hommes sont plus touchés par les maladies cardiovasculaires. Ce dimorphisme sexuel pourrait déjà exister au stade embryonnaire et concernerait également le placenta (Junien et al., 2012). Un certain nombre d'évidences suggère que le sexe de l'embryon joue un rôle significatif dans la détermination de la taille du fœtus, la nutrition, la morbidité et la survie (Gabory et al., 2012). De nombreuses équipes se sont alors penchées sur l'impact de différents régimes alimentaires maternels sur le développement du placenta. Ils se sont intéressés aux relations entre régime alimentaire et expression différentielle de certains gènes en fonction du sexe (Mao, et al., 2010).

Le régime alimentaire semble également influencer le sexe de la descendance dans certaines espèces de mammifères incluant la souris et l'Homme (Cui et al., 2005; Fountain et al., 2008; Rosenfeld et al., 2003). Un régime hypocalorique favorise en général la naissance d'individus mâles, alors qu'un régime hypercalorique tend à favoriser la naissance de femelles (Mathews et al., 2008; Meikle and Drickamer, 1986).

L'existence d'un dimorphisme sexuel dans les placentas est constitutionnelle car il est observé dans les placentas des groupes contrôles. La programmation nutritionnelle des

maladies métaboliques chez l'adulte présente également un caractère dimorphique peut avoir une origine placentaire. Les résultats obtenus par les modèles animaux de malnutrition (régime « High fat », dénutrition) montrent que la réponse du placenta en terme d'expression génique est différente entre le mâle et la femelle.

## 2-Les gènes soumis à empreinte

Le placenta est un organe qui exprime un grand nombre de gènes soumis à empreinte qui se caractérisent par le fait d'être exprimés de manière paternelle ou maternelle. Ces gènes sont bien souvent impliqués dans la régulation de la croissance fœtale. Le profil d'expression des gènes soumis à empreinte est modifié dans le cas d'altérations placentaires qui accompagnent le RCIU ou la macrosomie. Les gènes soumis à empreinte codent pour des protéines dont le rôle est essentiel dans le placenta et impliqués dans la capacité de transport des nutriments contrôlant ainsi la demande en nutriments du fœtus (Charalambous et al., 2010; Coan et al., 2005; Tycko and Morison, 2002). Des études génétiques portant sur le développement et l'évolution du dimorphisme sexuel ont établi que certaines marques épigénétiques portées par des gènes soumis à empreinte sont établies de manière sexe dépendante dès le stade blastocyste (Gebert et al., 2009).

Des expériences menées chez la souris ont permis de mettre en évidence qu'un régime hypercalorique durant la gestation entraîne une expression différentielle des gènes soumis à empreinte spécifique du sexe. Les méthylations globales de l'ADN sont également dépendantes du régime et du sexe. Les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de ces modifications épigénétiques sexe spécifique sont encore mal définies (Mao et al, 2010).

# Partie 1

Altérations placentaires et fœtales dans un modèle d'hyperglycémie gestationnelle chez le rat : le modèle Nicotinamide-Streptozotocine.

## Introduction

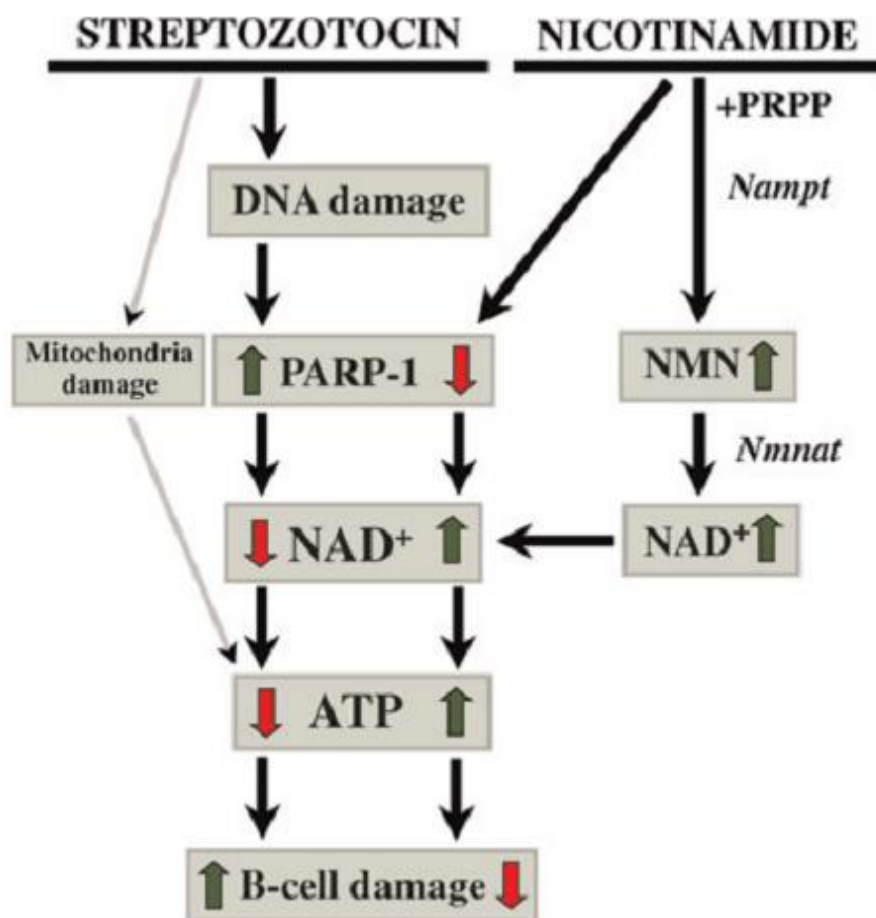
Le rôle délétère de l'environnement diabétique *in utero* est l'une des causes de la macrosomie, responsable d'une augmentation de la prévalence de l'obésité et du diabète chez l'enfant et l'adulte. Les différentes approches expérimentales d'induction du diabète gestationnel ont donné lieu à des résultats contradictoires en ce qui concerne le profil glycémique de la mère et la croissance du fœtus. Un modèle de diabète gestationnel a été décrit chez l'animal basé sur l'effet diabétogène de la streptozotocine au moyen de doses et de fenêtres d'administration variées. Ces modèles insulinoпрives par destruction quasi complète des îlots miment un diabète de type 1 pré-gestationnel non contrôlé ou mal contrôlé en cours de gestation et sont pour la plupart responsables d'un retard de croissance. Or, les modifications métaboliques au cours du diabète gestationnel conjuguent une baisse modérée de l'insulinosécrétion et une insulinorésistance physiologique révélées par une hyperglycémie modérée en période post prandiale.

Il existe une relation entre le statut glycémique de la mère pendant la gestation et le degré de macrosomie, de même qu'une hyperglycémie modérée en cours de gestation peut s'avérer délétère pour la croissance du fœtus. A ce titre, l'obtention d'un modèle animal reproduisant les anomalies du métabolisme glucidique qui accompagnent ces grossesses, permettrait une meilleure compréhension des mécanismes placentaires impliqués dans la macrosomie.

En 1998, Masiello et collaborateurs mettent au point un nouveau modèle chimique de diabète modéré chez le rat par administration conjointe de streptozotocine (STZ) et de nicotinamide (Masiello et al., 1998). Ce modèle, baptisé « nicotinamide-STZ » (N-STZ), est décrit comme un modèle de diabète de type 2 et est validé comme tel chez de nombreuses espèces, mais toujours en dehors d'un état gestationnel. Le nicotinamide, forme amide de la vitamine B3 protège la cellule bêta des effets cytotoxiques de nombreux agents diabétogènes tels que la STZ et l'alloxane. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont clairement démontré le rôle protecteur du nicotinamide vis-à-vis de l'action cytotoxique de la STZ.

Les données de la littérature montrent l'existence de deux mécanismes majeurs impliqués dans l'action inhibitrice du nicotinamide vis-à-vis des effets cytotoxiques de la STZ à savoir l'inhibition de PARP-1, et l'apport en NAD<sup>+</sup>, et sont représentés dans la figure 18.

**Figure 16 : Mécanismes d'action du Nicotinamide sur les effets cytotoxiques de la streptozotocine dans la cellule bêta.**



Les effets protecteurs du nicotinamide dépendent de la dose administrée, de l'âge de l'animal et du délai d'administration par rapport à celui de la STZ. A faible dose, le nicotinamide ne produit aucun effet, alors qu'un surdosage inhibe totalement l'action de la STZ. L'âge de l'animal est également déterminant dans l'efficacité du nicotinamide. Les cellules bêta de nouveau-nés ou de jeunes rats sont moins sensibles aux effets délétères de la

STZ que les cellules bêta issues de rats adultes et sont donc mieux protégées par le nicotinamide.

Alors que les rats rendus diabétiques par l'injection de STZ seule constituent des modèles de diabète de type 1, ceux traités par le nicotinamide et la STZ sont considérés comme développant un diabète de type 2. Le modèle du rat N-STZ se caractérise par un grand nombre d'anomalies fonctionnelles et métaboliques proches de celles observées chez l'Homme en cas de diabète de type 2. En particulier, les îlots de rat N-STZ ont une réduction partielle de la masse des cellules bêta et sécrètent moins d'insuline en réponse au glucose (Szkudelski, 2012).

### Objectif

L'étiologie du diabète gestationnel étant proche de celle du diabète de type 2, nous sommes inspiré du modèle N-STZ décrit chez le rat mâle pour le transposer chez la femelle gestante. Notre objectif étant d'induire une hyperglycémie modérée durant la gestation.

Dans un premier temps, nous avons mis au point un protocole expérimental d'hyperglycémie modérée au cours de la gestation, en administrant à des femelles 1 semaine avant la gestation, le nicotinamide puis la STZ.

Dans un second temps, nous avons recherché à identifier les marqueurs métaboliques maternels et fœtaux qui accompagnent la macrosomie et tenté de déterminer quelles sont les anomalies placentaires (structurales et moléculaires) susceptibles d'être impliquées dans la croissance accélérée du fœtus.

## Résultats majeurs

Nous pouvons dans un premier temps valider notre modèle comme étant un bon modèle d'hyperglycémie modérée durant la gestation. Les injections de nicotinamide et de STZ ayant été effectuées avant la gestation, nous pouvons affirmer que l'hyperglycémie est stable car l'effet protecteur du nicotinamide sur les cellules bêta perdure 20 jours après l'administration. L'activité insulinosécrétoire de la cellule bêta est diminuée uniquement en réponse à une charge orale en glucose, situation qui mime l'état post prandial. L'insulinémie et glycémie basales sont normales. Cependant le capital insulaire reste supérieur à 10%, seuil en dessous duquel une hyperglycémie chronique est observée. Cependant nous n'avons pas évalué la morphologie des îlots pancréatiques des mères N-STZ.

Les anomalies phénotypiques qui se traduisent par la survenue de nouveau-nés macrosomes, s'accompagnent de modifications placentaires et restreintes aux portées présentant 10 à 14 petits. Les altérations phénotypiques sont modulées si les portées sont plus petites ou plus nombreuses. Il est donc impératif de prendre en compte la taille de la portée quand on s'intéresse aux modifications de la croissance fœtale dans le cadre de la programmation. Ces observations mettent en évidence la capacité d'adaptation du placenta et place le « dialogue » mère-placenta-fœtus comme un déterminant majeur de la survie du nouveau-né et de la santé de la mère.

L'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie fœtale réactionnelle n'expliquent pas à elles seules les modifications de la croissance fœtale, et en particulier la macrosomie. L'analyse de l'expression génique placentaire identifie la lipoprotéine lipase LPL1 comme étant le seul gène surexprimé dans les placentas de nouveau-nés macrosomes. Ces résultats renforcent l'idée que la capacité du placenta à transférer les lipides constitue un élément clé de la croissance fœtale.

## **Partie 2 :**

Influence d'un régime hyperlipidique sur l'expression génique placentaire et la croissance fœtale chez le rat : impact de la programmation nutritionnelle



## Introduction

Des modifications de l'environnement nutritionnel et hormonal pendant les périodes critiques du développement du fœtus et du nouveau-né sont susceptibles d'altérer sa croissance et d'induire à long terme le développement de pathologies métaboliques telles que l'obésité, l'hypertension et le diabète de type 2.

Nos travaux antérieurs ont montré qu'une restriction alimentaire maternelle de 70% (modèle FR30) pendant toute la durée de la gestation, est responsable d'un petit poids de naissance dans la descendance traduisant un retard de croissance intra utérin, et prédispose à l'apparition d'anomalies métaboliques à l'âge adulte. Les rats mâles FR30, âgés de 4 mois ont développé certains traits de syndrome métabolique, se traduisant en particulier par une hypertension artérielle en relation avec une altération de l'activité du système Rénine-Angiotensine (SRA)(Riviere et al., 2005). Sur le plan métabolique, les rats mâles FR30 adultes présentent une hyperleptinémie, une hypercorticostéronémie et une hyperphagie sans phénotype d'obésité marqué (Breton et al., 2009). Ces animaux montrent également un décalage de la prise de nourriture en phase diurne en faveur d'une perturbation des rythmes biologiques (Breton et al., 2009).

Les rats mâles FR30 ne deviennent pas diabétiques, mais montrent des troubles du métabolisme glucidique (l'intolérance au glucose et une réduction de l'insulinosécrétion) et lipidique, qui sont exacerbés quand les animaux sont exposés à un environnement obésogène (Lukaszewski et al., 2011).

Fort de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que les rats femelles issues de mères dénutries soumises à un régime hyperlipidique à partir du sevrage seraient plus sujettes à développer un diabète gestationnel, exposant ainsi le fœtus à un environnement intra-utérin « diabétique » susceptible de modifier sa croissance. Afin de discriminer les effets du régime alimentaire de la mère avant la gestation de ceux observés au cours de la grossesse, ce régime dit « high fat » sera poursuivi pendant toute la gestation chez une moitié des animaux, l'autre moitié des animaux retrouvera un régime standard. Le choix de moduler le régime hyperlipidique chez les animaux en le limitant pour l'un des groupes expérimentaux à la période prégestationnelle, est justifié par les observations cliniques qui montrent clairement

que l'état nutritionnel et métabolique des mères diabétiques, et en particulier le statut lipidique en période prégestationnelle conditionne le bon déroulement de la grossesse et la morbidité fœtale (Lepercq et al., 2001).

Nos objectifs sont doubles :

- 1) Evaluer les effets d'un régime hyperlipidique chez la mère sur la croissance fœtale et le placenta
- 2) Déterminer l'impact de la programmation nutritionnelle et d'un régime hyperlipidique maternel sur le placenta. Le placenta est considéré à l'heure actuelle comme un organe clé de la programmation fœtale capable de s'adapter à son environnement.

# Matériel et méthodes

## 1) Animaux et protocole expérimental

Des rats Wistar femelles (250-260g) sont mises une nuit en présence d'un rat Wistar mâle afin de permettre l'accouplement (Charles Rivers laboratoires, l'albresle France). La présence de spermatozoïdes dans le frottis vaginal détermine le jour 0 du développement embryonnaire. Les femelles gestantes sont individualisées et maintenues dans des conditions standards d'élevage : cycle d'éclairage jour/nuit de 12h/12h (avec des phases diurnes 7h-19h) et température  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Les femelles gestantes de la génération F0 sont subdivisées en deux groupes dès le premier jour de gestation :

-un groupe contrôle **C** (n=30), constitué des femelles nourries *ad libitum* avec un régime standard (bouchons SAFE 04, Augy France) composé de 4% de cellulose, 3% de matières grasses brutes, 16,5% de protéines, 71,5% d'hydrates de carbone et 5,2 % de cendres brutes et d'additifs de cuivre et de vitamines A, D3 et E (2,900 cal/g).

-un groupe **FR** (n=35), constitué des femelles soumises à une restriction alimentaire de 70% pendant les trois semaines de la gestation (G0 à G21).

A la parturition, les mères contrôles et FR, dont les portées sont composées de 10 à 14 petits sont incluses dans l'étude. Les portées sont égalisées à 8 petits avec une préférence pour les femelles (5 femelles pour 3 mâles). Pendant les trois semaines de la lactation, les mères de la génération F0 du groupe C et FR ont libres accès à la nourriture. Au sevrage qui correspond au 21<sup>e</sup> jour de vie postnatale, les femelles C et FR de la génération F1 sont réparties en 2 groupes selon le régime alimentaire, régime standard (S) ou régime hypercalorique (HF), 23% de matières grasses brutes, 23% de protéines, 40% d'hydrates de carbone (4,720cal/g). Nous obtenons donc 4 groupes expérimentaux :

- groupe C S (n=15), constitué des femelles F1 issues de mères contrôles et nourries *ad libitum* avec un régime standard

- groupe C HF (n=25), constitué des femelles F1 issues de mères contrôles et nourries avec un régime alimentaire hypercalorique
- groupe FR S (n=15), constitué des femelles F1 issues de mères dénutries FR et nourries avec un régime standard
- groupe FR HF (n=25), constitué des femelles F1 issues de mères dénutries FR et nourries avec un régime hypercalorique

*Suivi des femelles de la génération F1*

Du sevrage, jusqu'à l'âge de 4 mois, les femelles de la F1 sont pesées toutes les semaines, et la prise alimentaire hebdomadaire est également mesurée. A l'âge de 3 mois, les femelles de la F1 subissent un test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT). Après un jeûne de 16 heures, les animaux reçoivent par gavage une solution de glucose à raison de 2g/kg. La glycémie est mesurée avant (T0) et 30, 60, 90, et 120 minutes après l'ingestion de glucose à l'aide d'un glucomètre (Accucheck ROCHE).

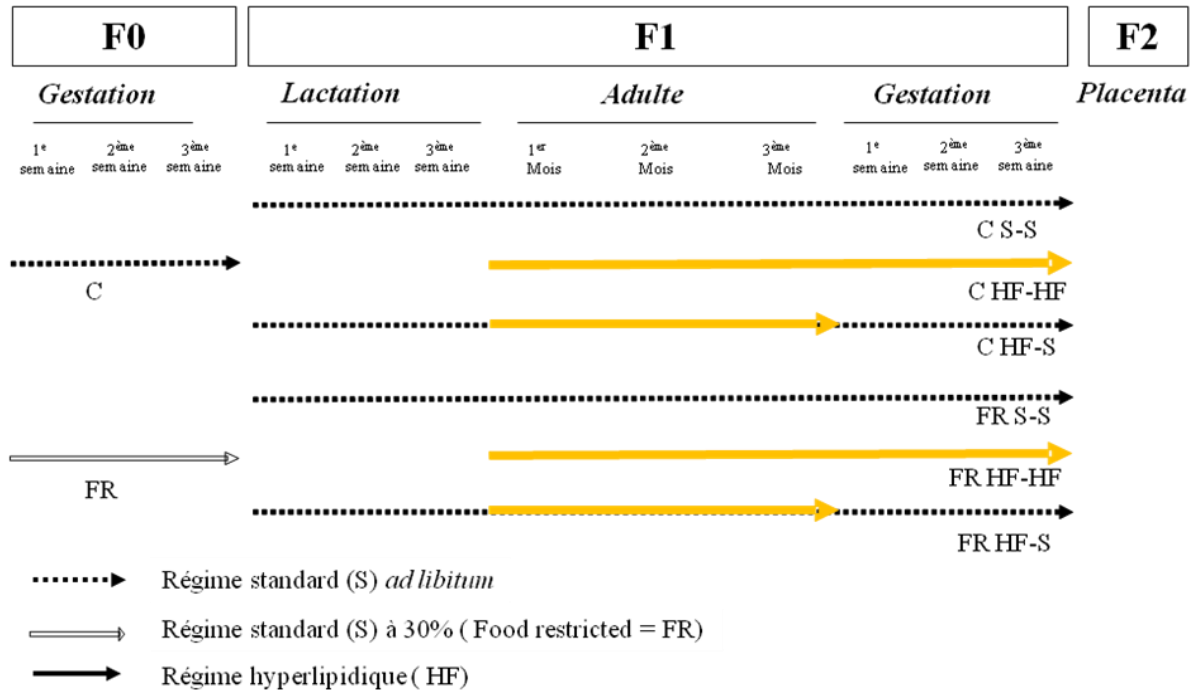
Au bout de trois mois de régime, les femelles de la F1 des 4 groupes expérimentaux sont mises en reproduction avec des rats mâles Wistar nourris avec un régime standard.

Au premier jour de la gestation (G0), les mères de la F1 nourries avec un régime standard (CS, FRS) maintiennent ce régime alimentaire pendant la gestation. En revanche, les femelles CHF et FRHF de la F1 soumises à un régime hypercalorique sont divisées en deux groupes ; un groupe nourri avec un régime standard et l'autre groupe continuant un régime hypercalorique. On se retrouve au total avec 6 groupes expérimentaux comme indiqué dans la figure n°19: C S-S, C HF-S, C HF-HF, FR S-S, FR HF-S, FR HF-HF ( n=6 femelles dans chaque groupe). La nomenclature est définie selon la signification des 3 sigles :

-le 1<sup>e</sup> sigle correspond à l'origine de la F0, -le 2<sup>e</sup> sigle correspond au régime alimentaire de la mère F1 avant la gestation, -le 3<sup>e</sup> sigle correspond au régime alimentaire de la mère F1 pendant la gestation

A la parturition, seules les femelles de la F1 ayant eues entre 10 et 14 petits sont retenues pour l'étude.

**Figure 17 : Schéma du protocole expérimental**



## 2) Prélèvements sanguins et tissulaires

Le sacrifice des mères de la F1 en fin de gestation (G21) est réalisé par décapitation en moins de 1 minute, afin de ne pas activer les systèmes neuroendocriniens de la réponse au stress (axe corticotrope et sympathosurrénalien) qui risqueraient de modifier les paramètres sanguins. Une césarienne est rapidement effectuée et les fœtus vivants de la génération F2 sont prélevés avec leur placenta respectif. Chez les mères de la F1, la glycémie est mesurée immédiatement et le sang est collecté dans des tubes contenant de l'EDTA à 5%, puis centrifugé 10 minutes à 5000g à 4°C. Le plasma est récupéré puis congelé à -20°C. Les tissus adipeux périgonadiques et périrénaux sont prélevés dans leur ensemble, pesés puis plongés directement dans l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C.

Les nouveau-nés mâles et femelles de la F2 sont pesés et le sang est prélevé au niveau axillaire. La glycémie est mesurée individuellement et le sang est ensuite poolé pour chaque portée selon le sexe dans des tubes contenant de l'EDTA à 5%, puis centrifugé 10 minutes à 5000g à 4°C. Le plasma est récupéré immédiatement puis congelé à -20°C.

Tous les placentas des nouveau-nés mâles et femelles de la F2 sont prélevés de façon stérile, pesés puis lavés dans trois bains successifs de PBS 0,1M, (pH 7,4) pour éliminer le sang au maximum et coupés en deux au niveau de la zone d'insertion du cordon :

- ½ placenta est incubé pendant 24 h dans une solution de RNA *later* (Qiagen, Inc. Valencia, CA, USA) à 4°C puis congelés à -80°C pour l'analyse génique.

- ½ placenta est directement plongé dans l'azote liquide puis congelé à -80°C pour l'analyse protéique.

### **3) Dosage plasmatique**

L'insuline plasmatique est déterminée par dosage immunoenzymatique à l'aide d'un Kit Elisa (DRG Ultra sensitive Rat Insuline Elisa, DRG International, Inc., USA), utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-insuline. La sensibilité du dosage est de 0,13µg/l (3,25µU/ml) et les coefficients de variation inter et intra assay sont respectivement de 5 % et 3,7 %.

La leptine plasmatique est déterminée par dosage immunoenzymatique à l'aide d'un Kit Elisa (rat Leptin Enzyme immunoassay Kit, SPI-BIO/Bertin Pharma Biotech Division, Brunschwig Germany), utilisant un anticorps monoclonal de rat anti-leptine. La sensibilité du dosage est de 50 ng/ml et les coefficients de variation inter et intra assay sont respectivement de 7% et 3,8 %.

La quantité de triglycérides TGs plasmatiques est déterminée par une méthode enzymatique et colorimétrique, utilisant la glycérophosphatase oxydase à l'aide d'un Kit (Triglycérides LBB, SOBIODA Montbonnot St-Martin, France). La sensibilité du dosage est de 6,0 mg/dl.

Le taux plasmatique de NEFA (acides gras libre) est déterminé par une méthode enzymatique et colorimétrique, utilisant l'Acyl-CoA-Synthétase puis l'Acyl-CoA-Oxydase à l'aide d'un Kit (NEFA C, ACS-ACOD, WakoChemicals GmbH, Allemagne). La sensibilité du dosage est de 52 l/mEq.

#### **4) RT-PCR quantitative**

##### Extraction des ARN totaux

Pour le placenta, un fragment de 30 mg est prélevé dans la zone labyrinthique. Le fragment de placenta est broyé à l'aide d'un polytron dans 800 µl de tampon RLT et 8 µl de bêtamercaptoéthanol, et purifié sur colonnes d'adsorption selon les instructions du Kit (*RNeasy mini-kit™ Qiagen*). Pour les tissus adipeux, un fragment de 30 mg de tissus est prélevé et broyé dans du trizol avant d'être purifié sur les colonnes Qiagen. Les broyats placentaires ou adipeux sont ensuite élués avec 40 µl d'eau RNase free. Les ARN totaux sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm, et leur intégrité est vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,2 %. Les ARN totaux sont conservés à -80°C.

##### Synthèse des ADNc : la Reverse transcriptase (RT)

La transcription des ARN totaux en ADNc est réalisée sous l'action de la transcriptase inverse (Kit *ThermoScript RT-PCR system, Invitrogen Life Technologie, Carlsbad, CA, USA*). Un premier « mix » est réalisé contenant 1µg d'ARN, 0,5 µl d'hexamères aléatoires (50ng/µl), 0,5 µl d'oligodT (50µM), 2 µl de dNTP (10mM) et 9 µl d'eau RNase free. Le tube est incubé pendant 5 min dans un bloc chauffant à 65°C afin de dénaturer les ARNs. On ajoute un second « mix » contenant 1µl d'eau, 4 µl de tampon (5X cDNASynthesis Buffer), 1µl de DTT (0,1M), 1µl de RNAsin (40U/µl), et 1µl d'enzyme (*ThermoScript R-T, 15U/µl*). Le tube contenant les 20µl de volume réactionnel final est incubé pendant 10 min à 25°C, 35 min à 55°C et la dénaturation des ADNc est effectuée 5 min à 85°C. Les ADNc sont conservés à -20°C.

##### Choix des oligonucléotides

Les oligonucléotides (Eurogentec, Inc., San Diego, CA, USA) sens et antisens de nos gènes d'intérêts (tableau n°1) ont été modélisés en tenant compte des paramètres suivants : 1) la spécificité du produit d'amplification généré, 2) se situer dans une portion de la région codante qui enjambe un intron de taille importante, empêchant l'amplification d'ADN génomique, et 3) amplifier une séquence d'environ 150 bases.

### Polymérase Chain Reaction (PCR) en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent à chaque cycle. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la PCR. Le nombre de cycles pour lequel le signal fluorescent devient significativement supérieur à celui du bruit de fond définit un seuil ou Ct « Cycle treshold » qui dépend de la quantité de matrice initiale. Il apparaît au début de la phase exponentielle d'amplification. Ainsi un nombre de Ct faible correspondra à une quantité de matrice initiale importante tandis qu'un Ct élevé sera associé à une faible quantité de produit à quantifier.

Des expériences préliminaires nous ont permis de déterminer pour chaque gène étudié les conditions d'amplifications optimales. Une gamme de dilution (1/4 ; 1/10 ; 1/40 ; 1/100) est réalisée à partir d'ADNc calibrateur provenant d'un pool d'ARNm de tissus témoins. Celle-ci permet de déterminer la dilution optimale d'ADNc et de calculer l'efficacité réelle de l'amplification (E) selon la formule  $E = 10^{(-1/S)} - 1$  où S représente la pente de la courbe. Le calibrateur sert à comparer les échantillons entre eux.

La réaction est réalisée dans une plaque de 96 puits, contenant 5µl de Master Mix (*QuantiTect SYBR Green PCR*, dNTP mix, HotstarTaq DNA polyméase), 0,5µl de chaque amorce sens et antisens (10µM), 3µl d'eau RNase free et 1µl d'ADNc dilué au 1/10. La réaction d'amplification est effectuée à l'aide d'un thermocycler (*Light-Cycler LC 2.0, ROCHE*). Chaque échantillon est dosé en duplicate pour un gène donné. Les paramètres utilisés pour la PCR en temps réel sont 15 minutes à 95°C pour l'inactivation de la Taq polymérase, puis l'amplification est conduite pour 50 cycles comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Étape	Température	Durée	Paliers
Dénaturation	95°C	15 sec	2°C/sec
Hybridation*	55 °C	20 sec	2 °C/sec
Élongation	72 °C	20 sec	2°C/sec
Courbe de fusion	60 °c à 90 °C		

\*La température d'hybridation peut varier pour certaines amorces.



La spécificité et la taille des amplicons sont vérifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6%.

L'analyse des résultats repose sur la méthode « advance » qui utilise les calculs suivants :

- Nous faisons la moyenne des Ct des duplicats de chaque échantillon « Ct ech » et du calibrateur pour « Ct cal » pour chaque gène étudié. Puis, nous établissons la moyenne géométrique des 3 gènes de référence pour chaque échantillon.
- Dans un premier temps, nous calculons « A », qui compare le niveau d'expression du gène d'intérêt entre le calibrateur et l'échantillon en prenant en compte l'efficacité E avec l'équation suivante :

$$A = E_{(\text{gène cible})}^{(Ct_{\text{cal}} - Ct_{\text{ech}})}$$

- Dans un second temps, nous calculons « B », qui compare le niveau d'expression des gènes de référence entre le calibrateur et l'échantillon avec l'équation suivante:

$$B = E_{(\text{gène cible})}^{(Ct_{\text{cal}} - Ct_{\text{ech}})}$$

- La quantification finale « C » pour un gène donné est déterminée par le rapport suivant :

Le cut off pour considérer qu'un gène montre une variation significative est la moyenne (témoins)  $\pm 2$ , donc les gènes sous exprimés ont une expression relative inférieure à 0.5, et les gènes surexprimés ont une expression relative supérieure à 2. Nous séparons les résultats des mâles et des femelles.

Dans un premier temps, l'analyse génique a été effectuée sur des pools constitués de cinq placentas provenant de différentes portées et sélectionnés en fonction du phénotype du fœtus. Pour chacun des groupes expérimentaux, et pour chaque phénotype au sein de ces groupes, 2 pools ont été réalisés. Les pools de placentas ont été effectués à partir des ARN totaux. Une fois les 5 ARN totaux poolés, on a produit l'ADNc. Les résultats des pools ont ensuite été confirmés individuellement sur les échantillons qui ont servis à constituer chaque pool.

## 5) Westernblot

Les protéines placentaires ont été extraites à partir de demi placenta dans un tampon de lyse contenant 250 mmol/l de sucrose, 10 mmol/l de tris Hepes (pH 7.4), 1 mmol/l d'EDTA, 1% Triton X-100, et 1:1000 d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma). La concentration protéique a été déterminée à l'aide de la méthode de Lowry en utilisant le kit de dosage DC proteinassay (Laboratoire Bio-Rad Marnes-La-Coquette, -France). Des quantités équivalentes de protéines et variables selon la protéine étudiée ont été déposées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE à 10% et transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, AmershamBioSciences, Chalfont, UK). Les membranes ont été bloquées avec 5% de lait écrémé dans du tampon TBS contenant 0.1% de Tween 20 toute la nuit à 4°C, puis incubées avec les anticorps primaires, (voir tableau) sur la nuit à 4°C. Après lavage avec un tampon TBS contenant 0.1% de Tween 20, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire (voir tableau) durant 1h à température ambiante. Après lavage, les bandes sont visualisées par amplification à la chimiluminescence ECL (AmershamBioSciences). Les membranes ont été déstrippées à l'aide du Reprob Agent, puis réincubées avec un anticorps anti-tubuline qui nous sert de protéine contrôle.

Tableau- Conditions d'utilisation des anticorps.

Protéine	clone	Quantité depose ( µg)	Dilution ac primaire	Dilution ac secondaire	Type d'ac secondaire
Apo4	Polyclonal	20	1/100	1/500	Goat IgG-HRP (sc-2056)
SNAT2	Polyclonal	40	1/400	1/800	Goat IgG-HRP (sc-2056)
CD36	Polyclonal	40	1/1000	1/1000	Goat IgG-HRP (sc-2056)
IFR1	Polyclonal	40	1/1000	1/1000	Mouse IgG-HRP (sc-2314)
IGFBP3	Polyclonal	40	1/200	1/800	Goat IgG-HRP (sc-2056)
tubuline	Monoclonal	20	1/5000	1/50000	Mouse IgG-HRP (sc-2314)
tubuline	Monoclonal	40	1/10000	1/10000	Mouse IgG-HRP (sc-2314)

Tous les anticorps proviennent de chez Santa Cruz, à l'exception de la tubuline qui vient de chez Sigma.

### Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GRAPH PRISM 4. Pour les variables continues, sont précisées la moyenne et la SEM. La comparaison des moyennes a été réalisée avec une analyse de variance multivariée, complétée par post test de Boneferoni. Le niveau de significativité est de  $p < 0.05$ .

Tableau 1 : Liste des primers

Gènes	Transcrit	Primer sens 5'-3'	Antisens 5'-3'	Amplicon
<b><u>Gènes de référence</u></b>				
PipiA	NM_017101	ATT CAT GTG CCA GGG TGG T	GAT GCC AGG ACC TGT ATG CT	110pb
B2M	NM_012512	ACC TGG GAC CGA GAC ATG TA	GAA GAT GGT GTG CTC ATT GC	134pb
HPRT	NM_012583	GTG TCA TCA GCG AAA GTG GA	ATG GCC ACA GGA CTA GAA CG	123pb
<b><u>Gènes d'intérêt</u></b>				
LPL 1	NM_012598	AAG GTC ATC TTC TGT GCC A	CAG CCC GAC TTC TTC AGA GA	115 pb
Phospholipase B1 Plb1	NM_138898.1	ACTCAGCTCGCGAGAGCCCT	GGGCTTGTCTTGGTGGGGC	114 pb
Apolipoproteine A4	CV105437.1	ACAAGCTGGTGCCTTCGCC	TGGCCCGTAGGTCCCTCGAGC	102 pb
FATcd36	XM_575338.2	GGACCCCAAGGACAGCACTGT	TGTGGTGCAGCTGCCACAGC	126 pb
FATP 1	NM_053580.2	TCCTGCGGCTTCAACAGCCG	AGAAGGCCAGGTTCCCCGGG	137 pb
FABP3	NM_024162.1	ATGGCGGACGCCTTTGTGCGG	TGGCAAAGCCCACACCGAGTG	88 pb
FABP 4	NM_053365.1	TGCGACGCCTTTGTGGGGAC	GGTGGCGAAGCCAACCTCCAC	87 pb
COX 1 (PTGIS1)	NM_031557.2	GCACCGTCCTGCTGGGTGAC	GTGCGTGGTGAGGCCTCCAC	133 pb
COX2 (PTGIS2)	NM_017232	TCCCCAGGTGCCATCATGCT	TGGTGGGTGGAGTGAGTCCTGC	115pb
Ptges: Prostaglandin E synthase	NM_021583.2	CCAACCCCGAGGACGCGTTG	GTTGCGGTGGGCTCTGAGGC	89 pb
PTGES3 Prostaglandin E synthase	NM_001130989.1	GTTTTCGAAAAGGAGAATCCGGCC	AGCCAATTAAGCTTTGCCCTTTCCT	70 pb
PPAR $\gamma$	NM_001145367.1	GCCTGCGGAAGCCCTTTGGT	AAGCCTGGGCGGTCTCCACT	136 pb
RXR $\alpha$	NM_012805.2	ATCCTCCTCCGGGCAGGCTG	CCACCCAGCACTGTGAGCG	133 pb
Rcp Chylomicron	NM-012688	GCGGGAAAAGGCCATCGGTG	CCTCAGCACCTGGCACTCGAC	127pb
Glut1	NM_138827	ATT AAA AAG GTG ACG GGC C	CGG TGG TTC CAT GTT TGA TT	120pb
Glut3	RN98055	GAC CAA GCG ACG GAG ATC	AGA GCT CCA GCA CAG TGA CC	108pb
Slc7a2	NM_017353.1	GCCTGCCTCTGCGTGCTACT	CCAGGGCCAGCAGTTTGGCA	103pb
SNAT2	NM_181090	AAG AGC TGA AGA GCC GCA GC	CGG CAA GCA AAT ACA TCA GA	117pb
Snat4	NM_1569874	CTG TTC CCC ATC CGT ACT TC	GAC GTT GTT GAG AGC GAT GA	120pb
Lat1	NM_031341	GCT GCC TGC ATC TGT CTC TTA	CAA TCA GCG CCA ACA CTT TA	118pb
Lat2	NM_054698	AGCGGCCTTGTGTCAAGG	GGGTGGGGAGGTGGGGAACA	148pb
GPx7	NM_2668568	GGCCCCCTCCAGAGACTCCC	TGGAGGTGTGGTGGGTGGAGTG	140pb
Glutathione peroxydase 4	NM_017165.2	CGGGAGGCAGGAGCCAGGAA	TGGGTGGGCATCGTCCCCAT	112pb
Glutathione peroxydase 1	NM_030826.3	CAGTTCGGACATCAGGAGAATGGCA	CCCACCACCGGTTCGGACAT	75pb

Glutathionereductase : GRS	U73174.1	GGCCCCCTTCCAGAGACTCCC	TGGAGGTGTGGTGGGTGGAGTG	140pb
Glutathione S-transferase Gstm2	NM_177426	CTGGGACATCCGTGGGCTGG	CGGGAGCATCCCCATGCTG	98pb
Glutathione S-transferase pi2 Gstp2	NM_012577.2	TCCAGTTTCGAGGGCGCTGT	TCCTCCTTCCAGCTCTGGCCC	70pb
HSPB6	NM-048558	ACCCTGGGAGCCCATCAGAGC	AAAGCCTGCCCCGGATGCCAC	104pb
Vdr : rcp vitamine D	NM_017058.1	ACGCAGCAGCTATGCCACCG	AGCTCTGGCCCTGGTCAGCC	96pb
Catalase : CAT4	NM_012520.1	AAGATGCTCCAGGGCCGCCT	ACGCGAGCACGGTAGGGACA	104pb
SOD1	NM_2656587	CCCGAGTGTGGGGCGACAAC	TCCAGAACTGCCTGAGTGGCCT	129pb
SOD2	NM_017051.2	GAGGCGCTGGCCAAGGGAGA	TGGCCCCCGCCATTGAACTTC	72pb
Melatoninreceptor 1 a	NM_053676.1	AGAAGCTCAGGAACGCAGGGAA	AGACGTCAGCGCCAAGGGAA	95pb
Melatoninreceptor 1b	NM_001100641.1	GCAAGCTGCGGAACGCAGGTAA	GGGTACAGGGCTACCACCAGGT	72pb
NOS2	NM_012611.3	GAAGTCCAGCCGACCACCC	CAGGGCCGTCTGGTTGCCTG	112pb
NOS3	NM_021838.2	TCCGCTACCAGCCTGACCCC	CGCCATCACCGTGCCCATGA	128pb
Cxcl14	NM_0548408.1	ATCTTTGGCTCGGAGGCGGC	CGGAGCACACGCTCTACCCC	101pb
Cxcl16	NM_054745.3	GTGGCATCCGGGCAGGCTTT	TAGAGGCCACATCGGACCCGC	77pb
Ccl3	NM_475838.2	CCAGAGTGGCATCCGGGCAG	AGAGGCCACATCGGACCCGC	74pb
Xanthine reductase	NM_45235411	CTTGGCTCAGCATGGCCGCT	AGTGTCGTTGGCCCCCTCA	143 pb
Xanthine oxydase	NM_48692807	CGACCCGGGAAGCCTGTCCT	CCAGCATTACCACGCCCGCA	79pb
IGF1	NM_475758	CCCGTGGCTTGTGCTTCGT	CGCCTCCACTCCCGAACGTG	100pb
IGF2	NM_31511	CGC GGC TTC TAC TTC AGC A	GTC TCC AGG AGG GCC AAG	115pb
IGFR1	NM_052807	TTG GAG ATT TTG GTA TGA CAC G	GAG GGA CTC GGG AGA CAT C	120pb
IGFR2	NM-012756	CCG TGT GTG CTG TGG ATA AG	CAC AGT CAT CGC CAT CAG AG	89pb
IGFBP1	NM_013144	GCCCCATCCCGTGAGGACCA	CCGTTGGCAGGGCTCCTTCC	111pb
IGFBP3	NM_012588.1	GGCTTCTGCTGGTGCGTGGA	CCACGTTAAGTGGCACAGCGGT	123pb
IGFBP5	NM_012817.1	GCGGAGAACACTGCCACCC	CGGCAGGGGCCTTGGTCAGA	74pb
INSR	NM_017071	AAC AAC CTG GCA GCT GAA CT	TTC CAA GGT CTC TCC TCG AA	117pb
IRS1	NM_0129969	ACA GAG AGT GGA CCC CAA TG	ATG CTG CTA CTG CTG CAA GA	119pb
IRS2	XM_001076309	CTC TTT GCC CCG CTC TTA C	GCT CCA GTC TCT CCT CTT CC	108pb
Angiopoietin-like 4	NM_199115.2	AGCCTCTCTGGTGGCTGGTGG	CTGCTGCCGTTGCCGTGGAA	90pb
Angiopoietin-like 2	NM_133569.1	GGCAACGCAGGCGACTCCTT	TGGGCACAGTTTCTGTGTAGACA	93pb
Angiopoietine2	NM_134454.1	CAGGACTCACAGGCACGGCG	GCGTCAACCACCAGCCTCC	136pb
VEGF	NM_031836	CTG GAG CGT TCA CTG TGA G	GCG AGT CTG TGT TTT TGC AG	112pb
Plgf	NM_6960	CGC TAA AGA CAG CCA ACA TC	ATT CGC AGA GCA CAT CCT G	122pb
Leptin	NM-013076	GTT CCT GTG GCT TTG GTC CT	CTG GTG ACA ATG GTC TTG ATG A	110pb
Rcpleptin 1 obrb	NM_020099	GGCCAGCCTGCCAGTGTACG	GTCCATCCAACCGCCGGCAG	71pb

Adiponectine	NM_144744.2	TACCGGGCCGTGATGGCAGA	ACCAAGAACACCTGCGTCTCCCT	71pb
AdipoR1	NM_207587.1	CCAGCCCAGCCAAGGCTGAA	TGGCATGGTGGGCTTGCAGA	102pb
AdipoR2	NM_001037979.1	TGTGTGCTGGGCATTGCAGC	AGCCCACGAACACTCCTGCTC	94pb
Lactogene placentaire	NM_012535.2	TCAGCAGGGTTCAACCTGGAGC	CCCTGCGCATGCACCGATAACA	129pb
Visfatin	NM_177928.3	AGACTGCCGGCATAGGGGCA	TGTGCTCTGCCGCTGGAACA	138pb
UCP2	NM_019354.2	GGGCTCAGAGCATGCAGGCA	TGGGCCTGGAAGCGGACCTT	114pb
CPT1A	NM_031559.2	TCCTCAGCAGCAGGTGGAGCT	GTCATCGGCAACCGGCCCAA	88pb
CPTT1C	NM_001034925.2	CAGACTGGGGCGGACAGCAC	CAG CCG TGG TGG GAC AGC AG	130pb
CTPT2	NM_012930.1	GAAGCAGCGATGGGCCAGGG	TGAGTCCTCTGGCCGTTGCCA	73pb
cytochrome P450i	NM_031576.1	TCAGGCGAGGGCAAGGAGCT	GTCGATGGGTGGCCGCAGTG	102pb
CYP4A2	NM_001044770.2	TCCACGCCTTCCCACTGGCT	GCAGGACTCGTGCTGTGCTCC	130pb
CYP4A3	NM_175760.2	CCTGCGTGCAGAGGTGGACA	TCAGGTGGGTGGCCAGAGC	96pb
CYP4A8	NM_031605.2	TCACCTGGGACGACCTGGACAA	CCGGGAAGGTGACAGGTGTGC	120pb
CACT = Slc25a20	NM_053965.2	CACGGTCAAGGTCCGACTGCA	GCCATGCCCCGATACAGCCC	132pb
Tnfa	NM_3698547	AGGAGTCTGCTGCGGTTTCGC	TTGGCGCTAGCCTTGGGGGA	112pb
Tnfar	NM_4587932	CGGGCGCTTATGTGCTCCGA	CCAGCCTTTGGCGCTAGCCT	101pb
Ilr6	NM_4798253	GGAGTCTGCTGCGGTTTCGCAT	GCGCTAGCCTTGGGGGATGG	103pb
rarres	NM_7895649	AGTCTGCTGCGGTTTCGCATCC	TTTGGCGCTAGCCTTGGGGG	126pb
ser	NM_1598736	ACCCTGGGAGCCCATCAGAGC	AAAGCCTGCCCGGATGCCAC	104pb

# Résultats

## 1-Profil métabolique et évolution du poids corporel et de la prise alimentaire des femelles de la génération F1 en période prégestationnelle

Le profil d'évolution du poids corporel des femelles F1 du sevrage jusqu'à la 12<sup>ème</sup> semaine de vie varie selon le phénotype de la mère (contrôle vs FR) et selon la nature du régime alimentaire (S vs HF).

La courbe d'évolution du poids corporel des femelles F1 issues de mère F0 contrôle et soumises à un régime « high fat » (C HF) ne montre aucune différence comparée à celle des femelles F1 sous régime standard (C S)(figure 1 A). Les femelles de la F1 issues de mère F0 dénutries et soumises à un régime standard (FR S) ne montrent aucune différence dans l'évolution de leur poids corporel par rapport aux femelles C S (figure 1A). En revanche, les femelles de la F1 issues de mère F0 dénutrie et mises sous un régime « high fat » (FR HF) ont une prise de poids inférieure à celle des femelles C HF ( $p<0.05$ ) et des femelles C S ( $p<0.05$ ) (figure 1A).

En ce qui concerne l'apport énergétique hebdomadaire exprimé en Kcal/g poids corporel, on constate que les femelles C et FR sous régime « high fat » ont un apport calorique plus important comparé aux femelles C et FR sous régime standard ( $p<0.05$ ) dès la 4<sup>ème</sup> semaine de vie, puis à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine, l'apport énergétique diminue et devient comparable à celui des femelles sous régime standard (figure 1B). Si l'on évalue la quantité de nourriture ingérée par semaine, on constate là encore une différence entre les femelles ayant un régime « high fat » et celles ayant un régime standard. En particulier la prise de nourriture hebdomadaire (exprimée en g/g poids corporel) est significativement réduite, et ce dès la 5<sup>ème</sup> semaine chez les mères FR et C recevant un régime hyperlipidique/hypercalorique. Cette diminution de la quantité de nourriture peut engendrer une carence en macronutriments, autres que les lipides comme les protéines et/ou hydrates de carbone.

Pour évaluer l'influence de la programmation fœtale et du régime alimentaire sur le métabolisme glucidique, un test oral de tolérance au glucose (OGTT) est réalisé après deux mois de régime. Le test de tolérance au glucose évalue la sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques plutôt que la sensibilité à l'insuline. Comparées aux femelles CS, les femelles FR S montrent une anomalie du métabolisme au glucose qui se manifeste par une intolérance partielle au glucose (figure 1C,  $p < 0.05$ ). Ce qui signifie que la programmation nutritionnelle induit chez la femelle, comme chez le mâle, un trouble du métabolisme glucidique. Le régime hypercalorique ne modifie pas la réponse à l'OGTT chez les femelles contrôle (figure 1C,  $p = 0.065$ ). A l'inverse, ce même régime chez les femelles FR accentue les anomalies de la tolérance au glucose. En effet, les glycémies chez les femelles FRHF à la 90<sup>e</sup> et 120<sup>e</sup> minute demeurent significativement élevées ( $> 150 \text{ mg/dl}$ ), signe d'une intolérance au glucose plus marquée (figure 1C,  $p < 0.05$ ). Les aires sous la courbe de la glycémie sont significativement augmentées chez les femelles FRS et FR HF comparées au groupe CS (figure 1C  $p < 0.05$  et  $p < 0.01$  respectivement).

*Le régime « high fat » utilisé dans notre étude ne perturbe pas le métabolisme glucidique de femelles issues de mères contrôles. En revanche ce régime hyperlipidique et hypercalorique est délétère chez les animaux issus de mères dénutries puisqu'il contribue à l'aggravation de l'intolérance au glucose.*

## **2-Profil morphométrique, hormonal et métabolique des mères de la génération F1 pendant la gestation**

Comparée aux mères témoins C S-S, les mères des groupes C HF-HF et C HF-S ne montrent aucune différence significative dans l'évolution du poids corporel (figure. 2A,  $p > 0.05$ ). De même, les mères FR HF-S présentent la même courbe d'évolution corporelle que les femelles FR S-S et C S-S. En revanche, les femelles FR HF-HF gagnent peu de poids entre la 1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> semaine de la gestation, et l'évolution de leur poids corporel est significativement diminuée pendant la gestation en comparaison des autres groupes (figure. 2A,  $p < 0.05$ ).

Le jour de la parturition, les femelles sont également pesées après extractions des cornes utérines, afin de déterminer le gain de poids net des mères pendant les 3 semaines de

gestation. De nouveau, les femelles FR HF-HF présentent un pourcentage de gain de poids corporel significativement plus faible comparé aux autres groupes (figure 2B,  $p < 0.05$ ).

Différents paramètres métaboliques et hormonaux ont été mesurés sur des prélèvements sanguins non à jeun au partum (G21). Les femelles du groupe C HF-S ne montrent aucune différence dans les taux plasmatiques des différents paramètres comparées aux femelles du groupe contrôle C S-S ( $p > 0.05$ ). Par contre, les femelles C HF-HF ont une hyperleptinémie et un taux plasmatique de NEFA significativement élevé (tableau 2,  $p < 0.05$ ). Toutes les femelles issues de mères dénutries quel que soit leur régime alimentaire (S ou HF), ont une hyperleptinémie (tableau 2). Hormis l'hyperleptinémie, les femelles FR S-S ne présentent pas d'autres altérations par comparaison aux femelles C S-S. Les femelles FR HF-S ont des taux plasmatiques de TGs plus faibles comparées aux femelles FR S-S (tableau 2  $p < 0.05$ ). Les femelles FR HF-HF quant à elles, présentent des anomalies, qui se traduisent par une hyperinsulinémie, des taux circulants de NEFAs élevés, et un taux plasmatique de TG diminué (tableau 2).

*Chez les femelles contrôles, le régime hyperlipidique en prégestationnel ne modifie pas le métabolisme énergétique de la mère. Par contre, si ce régime est maintenu pendant toute la gestation, il entraîne chez la mère une hyperleptinémie et une augmentation des taux plasmatiques de NEFA. Chez toutes les femelles issues de mères dénutries, la concentration plasmatique de leptine est augmentée, et ce indépendamment de la nature du régime. Cette hyperleptinémie est donc un marqueur métabolique de la programmation.*

Le régime « high fat » en prégestationnel chez les femelles FR n'entraîne pas d'altération significative des paramètres métaboliques et hormonaux. Par contre, on constate une baisse des taux plasmatiques de NEFAs, et une légère augmentation de l'insulinémie ( $p = 0.55$ ) par rapport aux femelles contrôles C HF-S ayant le même régime.

Le régime « high fat » chez les femelles FR lorsqu'il est maintenu pendant la gestation entraîne des effets comparables à ceux que l'on observe chez les femelles contrôles, à savoir une augmentation de la leptinémie et des NEFAs circulants, avec en plus une hyperinsulinémie et un taux de TG bas.

Afin de déterminer le degré d'adiposité des mères, les tissus adipeux blancs périgonadiques et périrénaux ont été pesés et rapportés au poids corporel de la femelle moins le poids des cornes utérines. La figure 3A montre que la masse du tissu adipeux périgonadique représente 3 à 4%



de la masse corporelle, et celle du tissu adipeux périrénal 1.5 à 2%. Cependant, le degré d'adiposité est identique dans tous les groupes. De même l'expression du gène de la leptine dans les deux tissus adipeux ne présente aucune différence entre les groupes (figure 3B). L'hyperleptinémie n'est pas en rapport avec la masse adipeuse et ne peut pas s'expliquer par une surexpression génique.

Si l'on s'intéresse à la répartition des macronutriments (ie lipides, protéines et glucides), on constate que l'apport en hydrates de carbone est significativement diminué chez les femelles C HF-S et FR HF-S par rapport aux femelles C S-S et FR S-S (tableau 3,  $p < 0.05$ ). En revanche, le régime alimentaire « high fat » des femelles C HF-HF et FR HF-HF se traduit par un apport en hydrates de carbone encore plus faible (tableau 3,  $p < 0.001$ ) et une carence relative en protéines, en particulier pour les femelles FR (tableaux 3  $p < 0.05$ ). Les lipides représentent près de 50% de l'apport énergétique, tandis que les glucides ne comptent que pour à peine 30% contre respectivement 75% et 73% dans le cas du régime standard.

*L'apport réduit en glucides dans le régime « high fat » peut être expliqué par l'absence d'obésité chez ses femelles. La réduction plus importante des glucides, associée à celle des protéines dans la ration alimentaire des mères FR HF-HF, peut être à l'origine du manque de gain de poids corporel que l'on observe au cours de la gestation chez les femelles.*

*-Le régime « high fat », administré pendant la période prégestationnelle et gestationnelle, est responsable chez les mères contrôles comme chez les mères FR d'un certain nombre d'anomalies métaboliques, qui ne sont associées ni à une obésité ni à une hyperphagie.*

*-Ces effets sont amplifiés chez les femelles FR, ce qui suggère que la programmation nutritionnelle potentialise les effets délétères d'un régime hyperlipidique chez la mère.*

### **3- Analyses phénotypiques des nouveau-nés de la génération F2**

A la naissance, les nouveau-nés mâles et femelles de chacun des groupes expérimentaux sont classés selon leur poids et répartis en 3 groupes :

Les nouveau-nés présentant un petit poids pour l'âge gestationnel (SGA) traduisant un RCIU. Le groupe est défini par un poids de naissance inférieur à la moyenne des témoins -1.7SD.

Les nouveau-nés présentant un poids normal pour l'âge gestationnel (AGA) et qualifiés de normotrophe. Ce groupe est défini par un poids de naissance compris entre la moyenne  $\pm 1.7SD$ .

Les nouveau-nés présentant un gros poids de naissance pour l'âge gestationnel (LGA) et traduisant une macrosomie. Ce groupe est défini par un poids de naissance supérieure à la moyenne des témoins  $+1.7SD$ .

La moyenne est calculée à partir du poids de naissance des nouveau-nés contrôles issus de mère C S-S, et en tenant compte du sexe.

La répartition globale des différents phénotypes chez les nouveau-nés est représentée dans la figure 5.

Les nouveau-nés issus de mères FR S-S présentent la même répartition phénotypique que les nouveau-nés issus de mères contrôles C S-S (figure 5). Les mères F1 issues de mères contrôles ou dénutries et ayant eu un régime alimentaire hyper gras avant et pendant la gestation (C HF-HF et FR HF-HF) donnent naissance à des nouveau-nés F2 présentant un phénotype identique et marqué par un fort pourcentage de SGA (42% des nouveau-nés F2 issus de mères C HF-HF et 51% chez nouveau-nés F2 issus de mères FR HF-HF). Aucun nouveau-né qualifié de LGA n'est observé à l'issue de ces gestations, de même que le pourcentage d'AGA est réduit.

Les femelles FR HF-S sont les seules à donner naissance à des nouveau-nés macrosomes puisque le pourcentage de LGA chez ces femelles est de 52% (figure 5). En revanche, chez les femelles C HF-S, la répartition phénotypique des nouveau-nés est comparable à celle des femelles contrôles C S-S. Afin de déterminer l'existence d'un dimorphisme sexuel, la répartition des phénotypes SGA LGA a été évaluée séparément chez les nouveau-nés mâles et chez les nouveau-nés femelles (figure 6).

Un dimorphisme sexuel est présent dans le phénotype des nouveau-nés issus de mères contrôles C S-S avec un phénotype LGA plus prononcé chez les mâles et un phénotype SGA plus prononcé chez la femelle. A l'inverse, chez les femelles FR S-S, le phénotype SGA est plus élevé chez les nouveau-nés mâles tandis que le phénotype LGA est plus marqué chez les nouveau-nés femelles.

Les effets du régime « high fat » avant la gestation chez les mères contrôles n'a aucun effet sur le phénotype de la F2. Cependant le dimorphisme sexuel n'est plus visible car il y a autant de macrosomes chez les mâles que chez les femelles. Parmi les femelles qui présentaient des phénotypes spécifiques de SGA ou LGA, là encore on remarque l'existence d'un dimorphisme sexuel (figure 6).

Le régime « high fat » administré aux femelles contrôles et FR avant et pendant la gestation entraîne un RCIU qui touche davantage les nouveau-nés mâles que les nouveau-nés femelles. Cependant le dimorphisme sexuel est plus prononcé chez les nouveau-nés issus de mères FR HF-HF.

Les nouveau-nés mâles sont donc plus sensibles au RCIU en réponse au régime de leur mère F1 (ici régime « high fat »), mais aussi à celui de leur grand-mère F0 (dénutrition) (figure 6 A).

Le régime « high fat » avant la gestation entraîne une macrosomie uniquement chez les mères F1 issues de mères dénutries FR HF-S. La macrosomie touche davantage les descendants femelles que les descendants mâles (figure 6 B). A l'instar des descendants mâles, les femelles sont donc sensibles au régime alimentaire de leur mère F1 (régime « high fat » avant la gestation) et de leur grand-mère F0 (dénutrition) mais avec un phénotype opposé. La programmation nutritionnelle à elle seule (dénutrition F0) sans modification du régime alimentaire de la mère F1 (FR SS) modifie également la croissance de la descendance F2 de manière sexe-spécifique, en favorisant chez les nouveau-nés mâle un RCIU, et chez les nouveau-nés femelles une macrosomie. Les manipulations du régime alimentaire des mères F1 issues de mères dénutries, que ce soit en période pré-gestationnelle ou pendant la gestation contribuent à accentuer ce dimorphisme sexuel.

La répartition des nouveau-nés en fonction de leur poids de naissance montre que chez les mères qui donnent naissance à des nouveau-nés RCIU ou macrosomes, le poids de naissance des nouveau-nés normotrophes issus de ces mêmes portées est comparable à celui des normotrophes issus des mères contrôles C S-S (figure 6 C).

#### 4- Analyses morphométrique, moléculaire et protéique des placentas

##### a) Analyse morphométrique

Le poids du placenta ainsi que le rapport poids du fœtus/poids du placenta utilisé pour évaluer l'efficacité du transport placentaire sont représentés dans le tableau 4. Chez les femelles du groupe contrôle, nourries avec un régime « high fat » avant la gestation (C HF-S), et qui donnent naissance à des normotrophes, les paramètres placentaires sont comparables à ceux du groupe témoin C S-S. En ce qui concerne les femelles soumises à un régime « high fat » avant et pendant la gestation (C HF-HF), et qui donnent naissance à une majorité de nouveau-nés avec un petit poids de naissance, on constate que chez les SGA la masse placentaire n'est pas modifiée tandis que le rapport F/P est significativement diminué aussi bien chez le mâle que chez la femelle (tableau 4,  $p < 0.05$ ). Cependant, ces modifications ne sont pas spécifiques du phénotype SGA, puisque chez les normotrophes (ou AGA) l'efficacité placentaire (F/P ratio) est également diminuée (tableau 4  $p < 0.05$ ). Chez les femelles issues de mères dénutries, soumises à un régime standard, (FR S-S) et qui donnent naissance à des nouveau-nés normotrophes, les paramètres placentaires sont identiques à ceux du groupe témoin C S-S. Chez les femelles FR, soumises à un régime HF en prégestationnel et qui donnent naissance à une majorité de macrosomes (LGA), on constate une augmentation du poids placentaire, et une diminution significative de l'efficacité placentaire seulement chez les femelles comparées au groupe FR S-S (tableau 4,  $p < 0.05$ ). En revanche, les paramètres placentaires ne sont pas modifiés chez les femelles normotrophes. Enfin, chez les femelles FR soumises à un régime « high fat » avant et pendant la gestation et qui donnent naissance à une forte proportion de nouveau-nés ayant un petit poids de naissance (SGA), le profil est différent de celui que l'on observe chez les femelles contrôles soumises au même régime CHF-HF. En effet, les placentas des nouveau-nés SGA mâles et femelles issus des mères FR HF-HF sont significativement moins gros, alors que l'efficacité placentaire n'est pas altérée. Les raisons du retard de croissance chez les nouveau-nés issus de mères FR HF-HF et de mères C HF-HF sont probablement différentes. Les nouveau-nés mâles et femelles issus de mères FR HF-HF et qui sont normotrophes (AGA) ont un placenta dont le poids est supérieur à celui des normotrophes issus de mère FR S-S, alors que l'efficacité placentaire est comparable (tableau 4  $p < 0.05$ ).

## b) Analyse de l'expression génique

Près de 70 gènes impliqués dans le transport de nutriments, le métabolisme lipidique, la croissance placentaire, l'inflammation et le stress oxydatif ont été analysés sur les placentas de la F2.

Les résultats ne font apparaître que les gènes qui montrent une variation significative (moyenne  $\pm 2$ ), donc des gènes sous exprimés ont une expression relative inférieure à 0.5, et les gènes surexprimés ont une expression relative supérieure à 2 (figure 7 A). Pour les groupes C HF-S, C HF-HF et FR S-S, le groupe de référence pour quantifier une sous ou sur expression est le groupe C S-S. Pour les groupes FR HF-S et FR HF-HF, le groupe de référence est FR S-S. Les résultats concernant les mâles et les femelles ont été séparés.

L'analyse des gènes est faite en 2 temps dans chacun des groupes C et FR. Tout d'abord, nous déterminons les gènes exprimés différemment dans les placentas en réponse au régime « high fat » de la mère. Puis dans un second temps, nous tentons d'identifier les gènes associés au phénotype RCIU ou macrosomie. Dans les 2 cas, nous séparons l'analyse des gènes en fonction du sexe, afin de mettre en évidence un dimorphisme sexuel.

### **1) Expression génique en réponse à un régime alimentaire hyperlipidique dans les placentas contrôles : analyse des placentas C HF-S et C HF-HF**

Nous observons très peu de différences dans l'expression génique des placentas femelles issues de mères C HF-S comparé au C S-S, avec seulement deux gènes sous exprimés (VLDLR, et PLGF) et un gène surexprimé (ApoA4). A l'inverse, les placentas des mâles montrent une majorité de gènes sous régulés qui sont impliqués dans la vascularisation (VEGF, Angptl4, Angptl2, Angpt2), le métabolisme lipidique (VLDLR), le transport de nutriments (LAT1, SNAT2, SNAT4), la croissance cellulaire (IRS2, IGF2, IGFR1, IGFR2, INSR, PLGF) et l'inflammation (TNFa, ILR6, COX2), et aucun gène surexprimé.

Les placentas des mâles issus de mères C HF-HF présentent également une sous expression de ces mêmes gènes à l'exception des gènes Rares et Serpine impliqués également dans l'inflammation. A l'inverse, les placentas des femelles montrent plutôt un profil de surexpression génique qui touche des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (AdipoR2, ApoA4, FABP3).

Certains gènes, comme adipor2, angpl4 et INSR sont exprimés différemment dans les placentas mâles en réponse au régime « high fat » de la mère quand celui-ci est administré

avant la gestation alors que ces mêmes gènes sont modulés dans les placentas femelles uniquement si le régime hyperlipidique est poursuivi pendant la gestation. Ce qui signifie que ces gènes sont avant tout sensibles au régime « high fat », et que cette sensibilité est dépendante du sexe. Il faut poursuivre le régime « high fat » pendant la gestation pour que leur expression soit affectée dans les placentas femelles. Le RCIU qui caractérise les nouveau-nés issus de mère C HF-HF s'accompagne de modifications de l'expression génique placentaire qui sont sexe-spécifique. En effet, on observe un profil d'expression génique opposé qui se caractérise par une majorité de gènes sous régulés dans les placentas mâles contre une proportion plus importante de gènes sur régulés dans les placentas femelles. On observe également un dimorphisme sexuel dans les gènes qui sont dérégulés. Les gènes dérégulés dans les placentas des nouveau-nés RCIU mâles sont des gènes de l'inflammation, tandis que ceux dérégulés dans les placentas femelles contrôlent des fonctions métaboliques.

## **2) Expression génique dans les placentas en réponse à la programmation nutritionnelle : analyse des placentas FR S-S**

L'analyse moléculaire des placentas des nouveau-nés mâles et femelles issus de mères FR S-S montre que 44% des gènes étudiés (31/70) sont exprimés de manière différentielle, dont 24 sont up régulés et 7 down régulés comparés au C S-S. Les gènes surexprimés sont impliqués dans le métabolisme des lipides et le stress oxydatif, tandis que les gènes sous exprimés contrôlent le développement du placenta. En revanche, ce profil d'expression est beaucoup plus marqué dans les placentas mâles que les placentas femelles (figure 7A).

## **3) Expression génique en réponse à un régime alimentaire hyperlipidique dans les placentas FR : analyse des placentas FR HF-S et FR HF-HF.**

Les placentas FR S-S présentent un profil d'expression génique différent de celui des placentas du groupe contrôle C S-S, et montrent de ce fait que la dénutrition maternelle programme dans la seconde génération certains gènes placentaires. Afin de déterminer l'influence du régime hyperlipidique sur la réponse génique placentaire, nous avons analysé le niveau d'expression des gènes dans les placentas FR HF-S et FR HF-HF par comparaison à celui des placentas FR S-S.

Les résultats montrent que le régime « high fat » de la mère en prégestationnel est capable de moduler l'expression d'un certain nombre de gènes dans les placentas mâles. En revanche, si

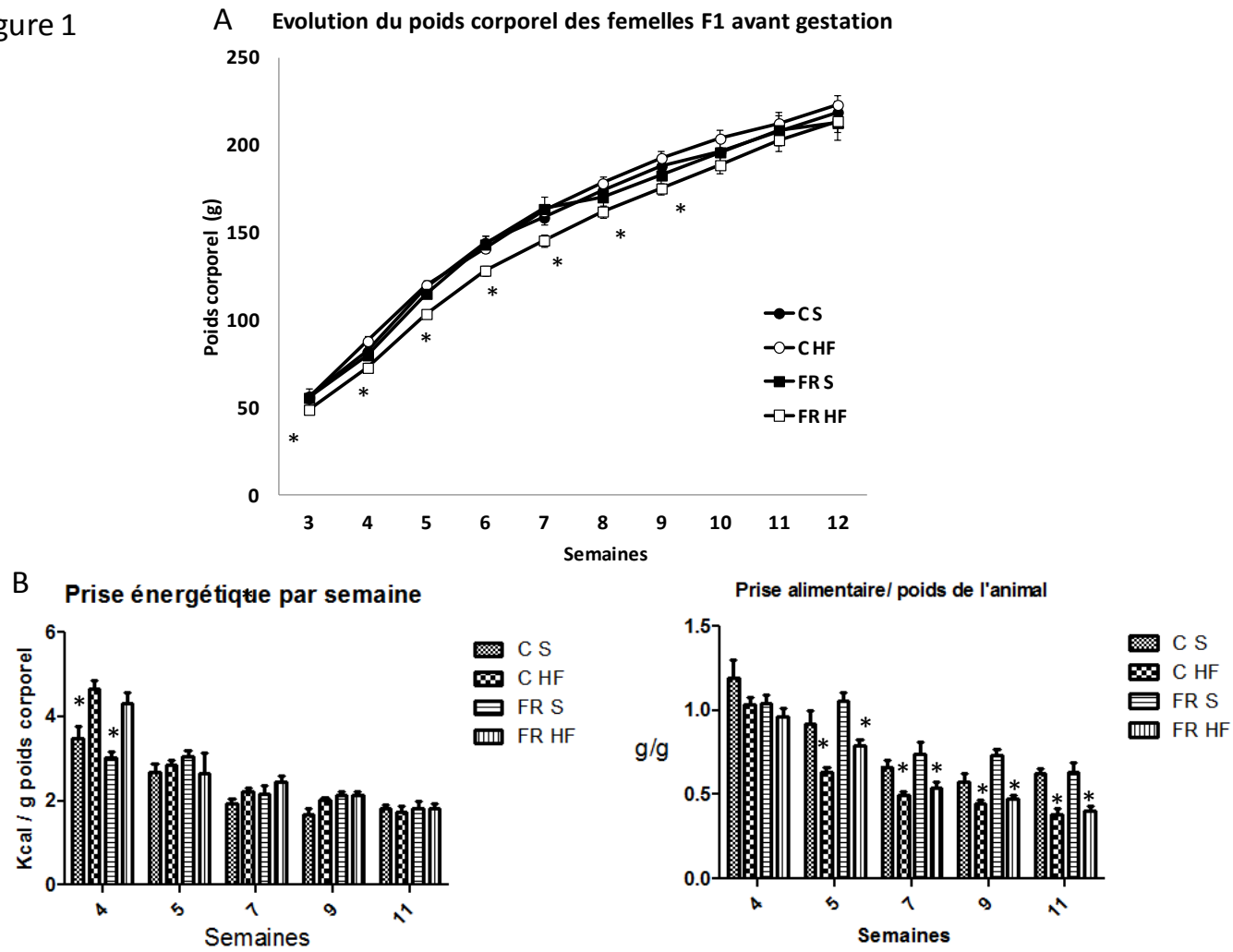
le régime « high fat » de la mère se prolonge durant la gestation, ces mêmes gènes sont alors dérégulés dans les placentas femelles. Les gènes qui sont pour la plupart impliqués dans la maturation du placenta (facteurs de croissance, facteurs angiogéniques) et dans l'inflammation, sont modulés par le régime « high fat » mais avec une sensibilité différente entre les mâles et les femelles. Si l'on analyse les gènes, exprimés différenciellement dans les placentas des nouveau-nés FR HF-HF et qui semblent associés au RCIU, on constate que la majorité d'entre eux présente un profil de sous expression. En effet, le phénotype RCIU s'accompagne dans les placentas mâles comme dans les placentas femelles d'une diminution de l'expression des gènes CACT, SNAT4, Ptges, CAT4, IRS1, Glut1, rares et LAT1. De plus, des gènes associés au RCIU sont spécifiquement dérégulés dans les placentas mâles ou femelles. Les gènes Adipo, SIC7A2, Glut3, lepr1, et Gstp2 sont up régulés et le gène SERPIN est down régulé dans les placentas mâles, tandis que les gènes Anptl4, Lep, Glut3, SLC7A2 et tnfr sont down régulés dans les placentas femelles.

Enfin, l'analyse des gènes placentaires associés à la macrosomie montre que peu de gènes sont modulés (8 gènes) et tous de manière sexe-spécifique. La macrosomie chez les mâles s'accompagne d'une sous expression du gène Angpl4 et d'une surexpression des gènes CPT1C et adipo R2, tandis que chez les femelles, elle est associée à une diminution des gènes VLDLR, LAT1, Rares et Serpine 2.

L'analyse génique a été effectuée sur des pools d'échantillons caractérisant chacun des phénotypes étudiés. Afin de nous assurer de la validité de nos résultats, nous avons réalisé une analyse par Q RT-PCR sur les échantillons individuels qui ont servi à constituer les pools. Les résultats obtenus sont conformes à ceux des pools (Figure 7B).

L'analyse protéique a été effectuée sur des placentas mâles et femelles présentant un phénotype marqué (RCIU/Macrosomie). Nous avons analysé 5 protéines (Apoa4, IGFBP3, SNAT2, CD36 et IGFR1). Nous n'observons pas de différence significative dans l'expression protéique entre les différents groupes bien que l'expression génique soit modulée.

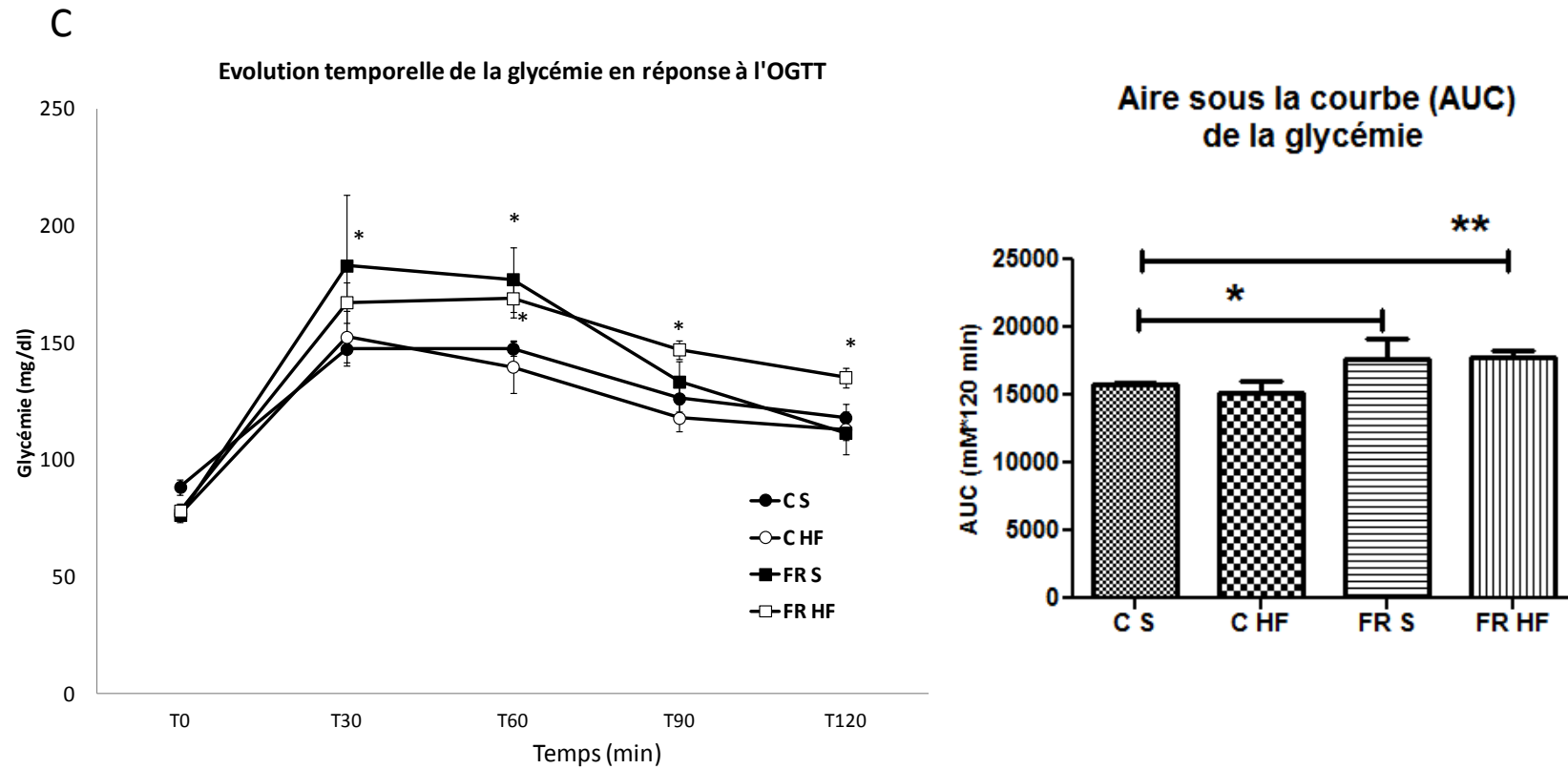
Figure 1



Evolution du poids corporel et de la prise alimentaire des femelles de la génération F1 en période pré-gestationnelle. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SEM , \* $p < 0.05$  comparé aux C S-S.

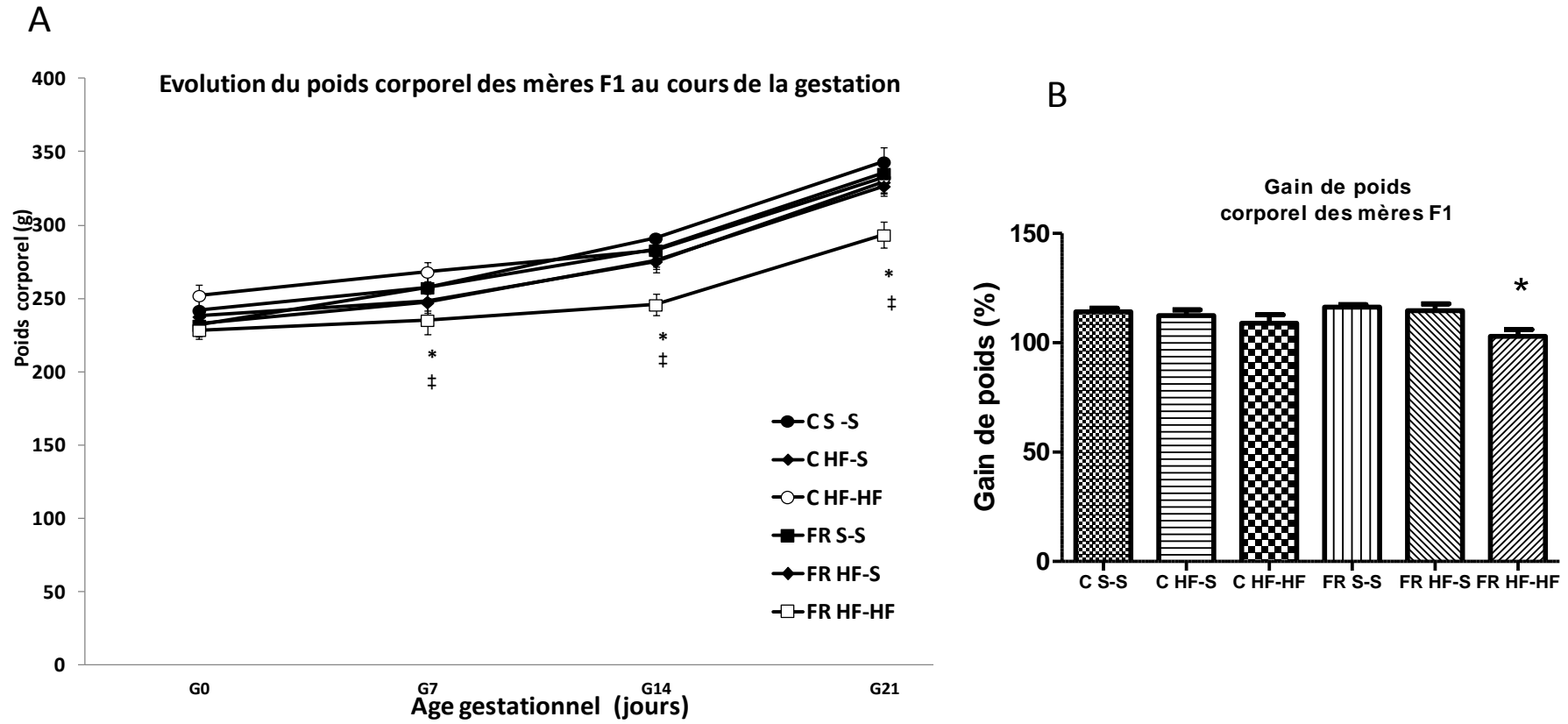


Figure 1



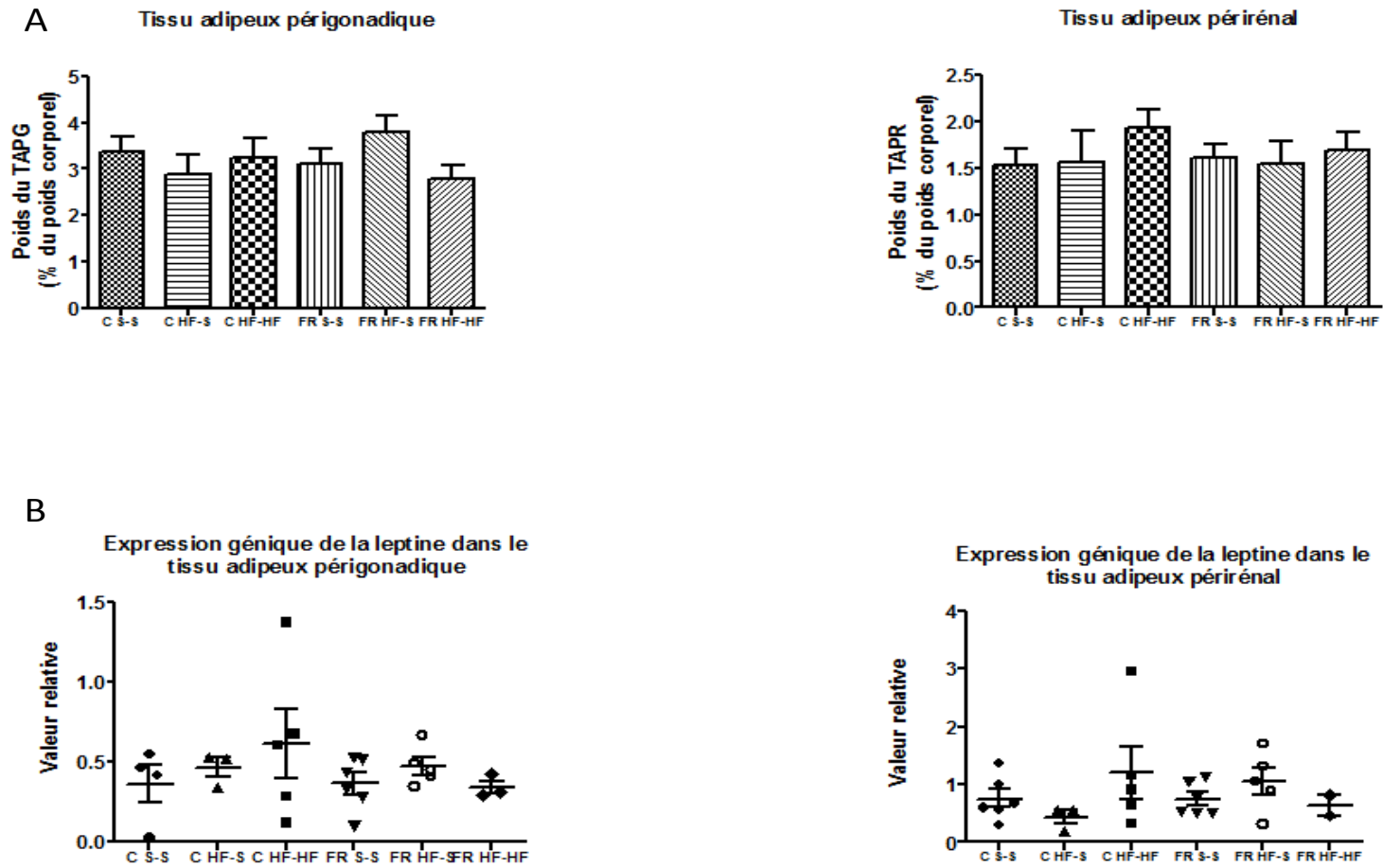
Profil glycémique des femelles de la génération F1 en période pré-gestationnelle. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SEM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  comparé aux C S-S.

Figure 2



Evolution du poids corporel des femelles F1 au cours de la gestation. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SEM, \* $p < 0.05$  C S-S vs FR HF-HF, † $p < 0.05$  FR S-S vs FR HF-HF.

Figure 3



Profil hormonal et métabolique des mères de la génération F1 pendant la gestation.

Figure 4

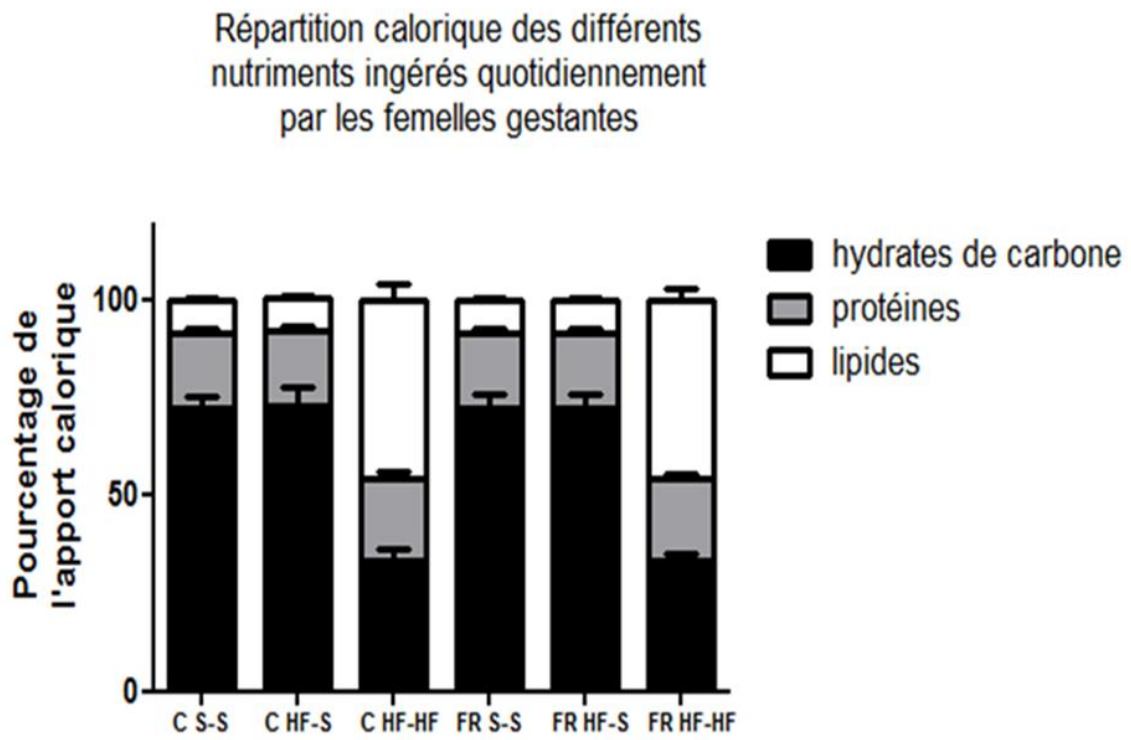
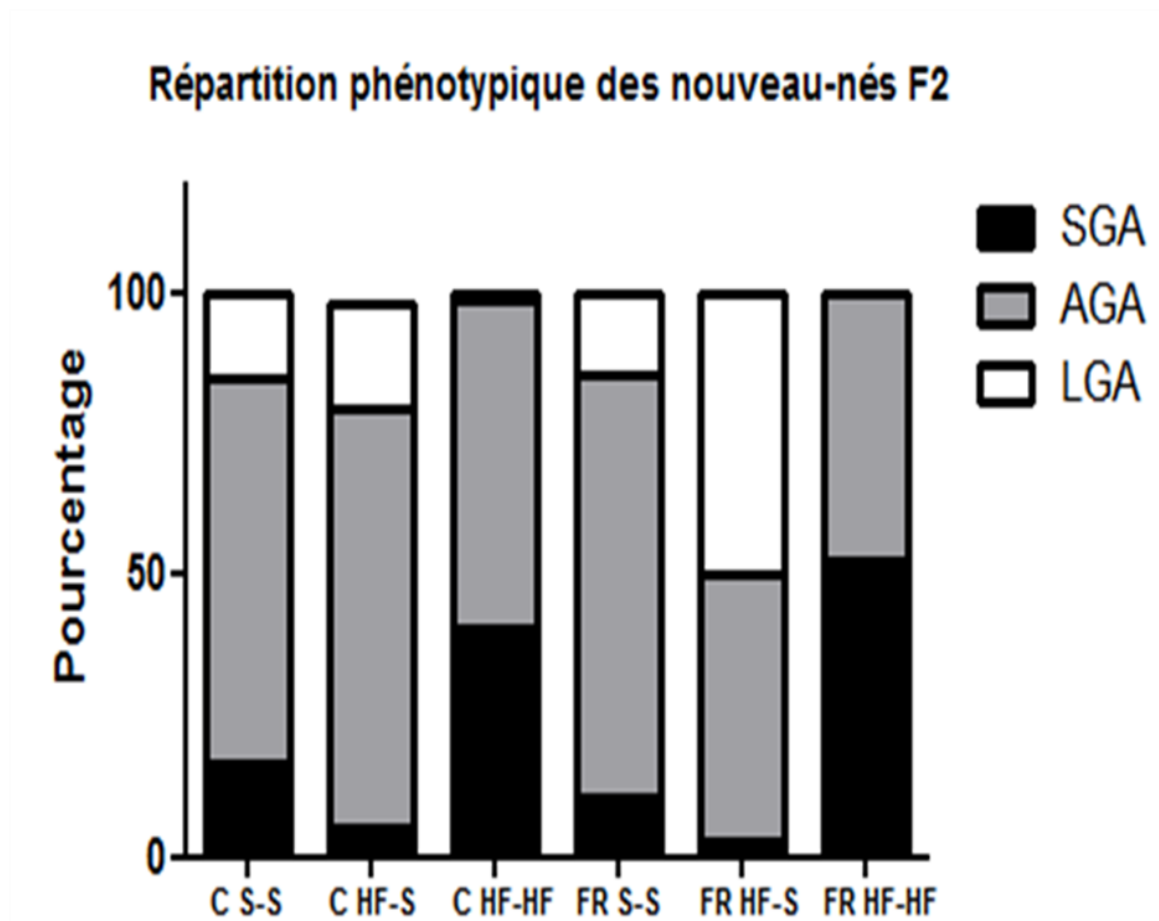


Figure 5

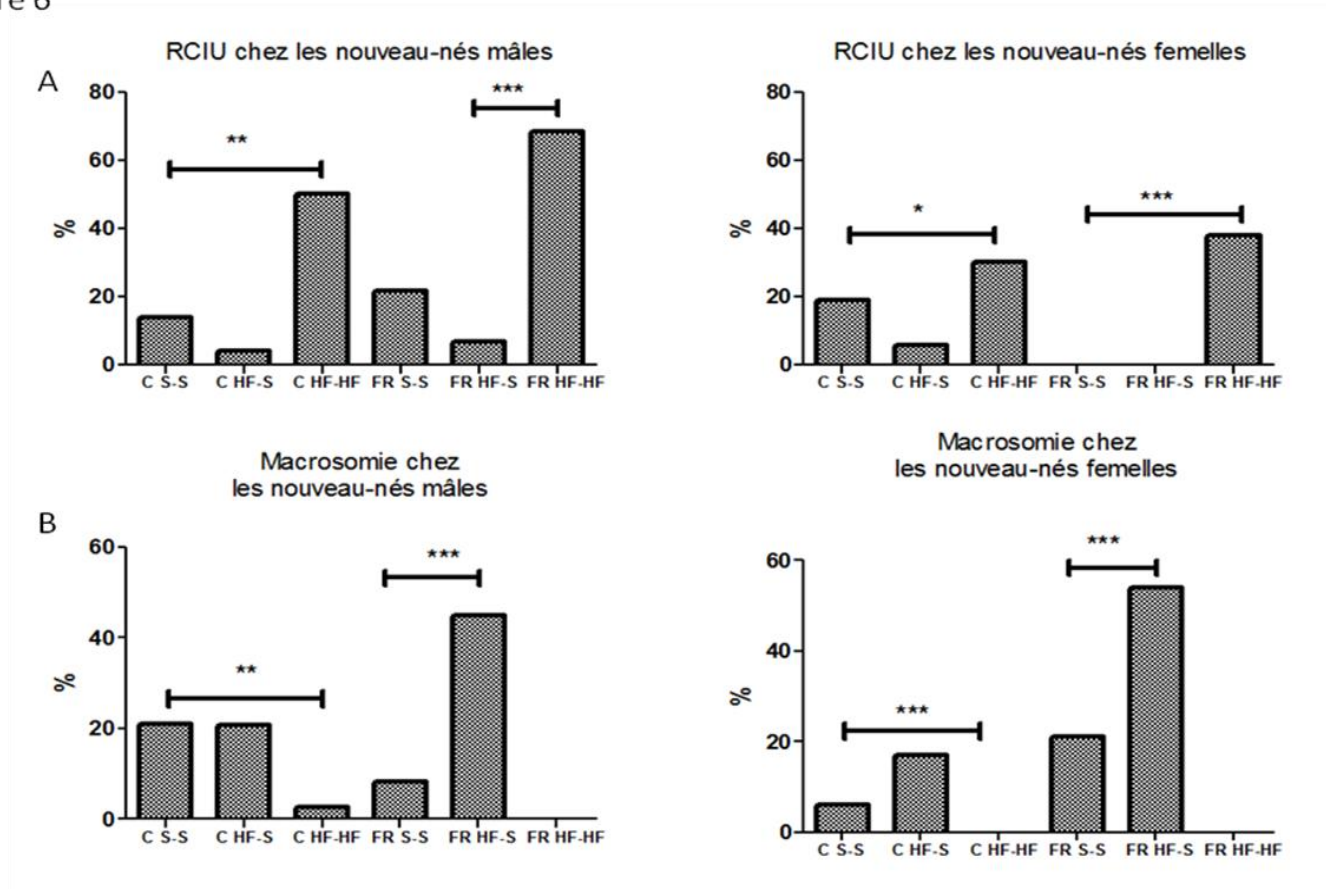


SGA: petit poids pour l'âge gestationnel traduisant un RCIU (retard de croissance intra utérin)

AGA : poids normal pour l'âge gestationnel qualifié de normotrophe

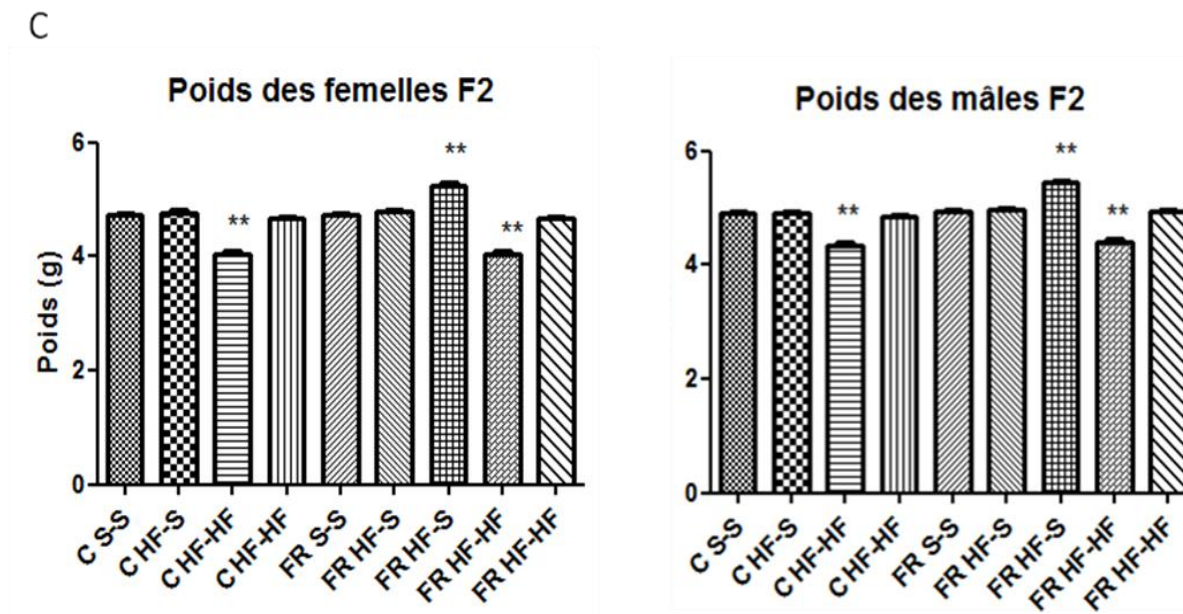
LGA : gros poids de naissance pour l'âge gestationnel traduisant une macrosomie

Figure 6



Répartition des phénotypes de RCIU ou macrosomie chez les nouveau-nés de la F2 en fonction du sexe. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

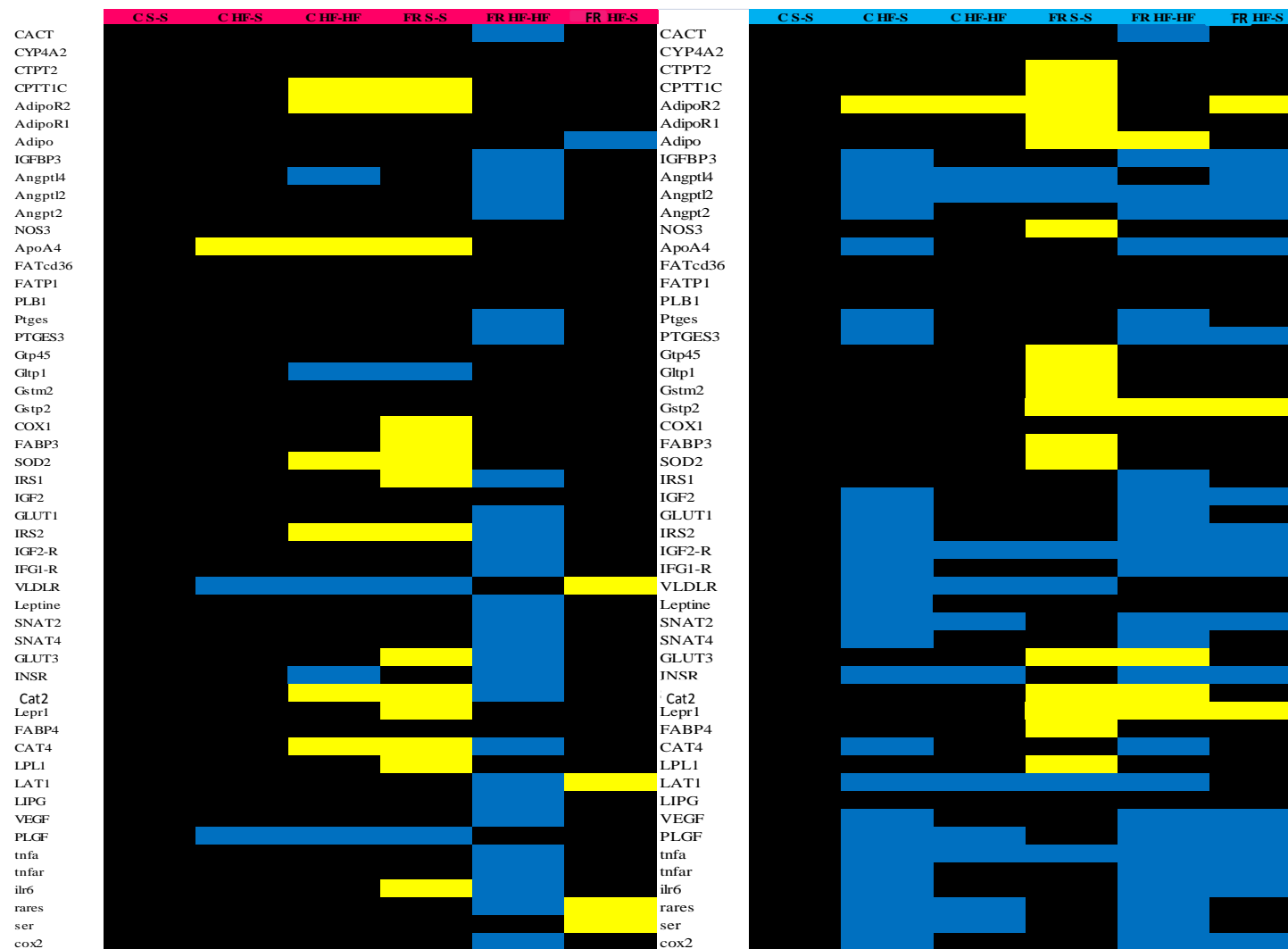
Figure 6



Poids des nouveau-nés de la F2 à la naissance. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ SEM, \*\* $p < 0.01$  comparé aux C S-S.

Expression génique placentaire des nouveau-nés de la F2 (fait sur des pools). En bleu la sous expression, en jaune la surexpression.

Figure 7A





Expression génique placentaire des nouveau-nés de la F2 fait sur des échantillons individuels.

Figure 7 B

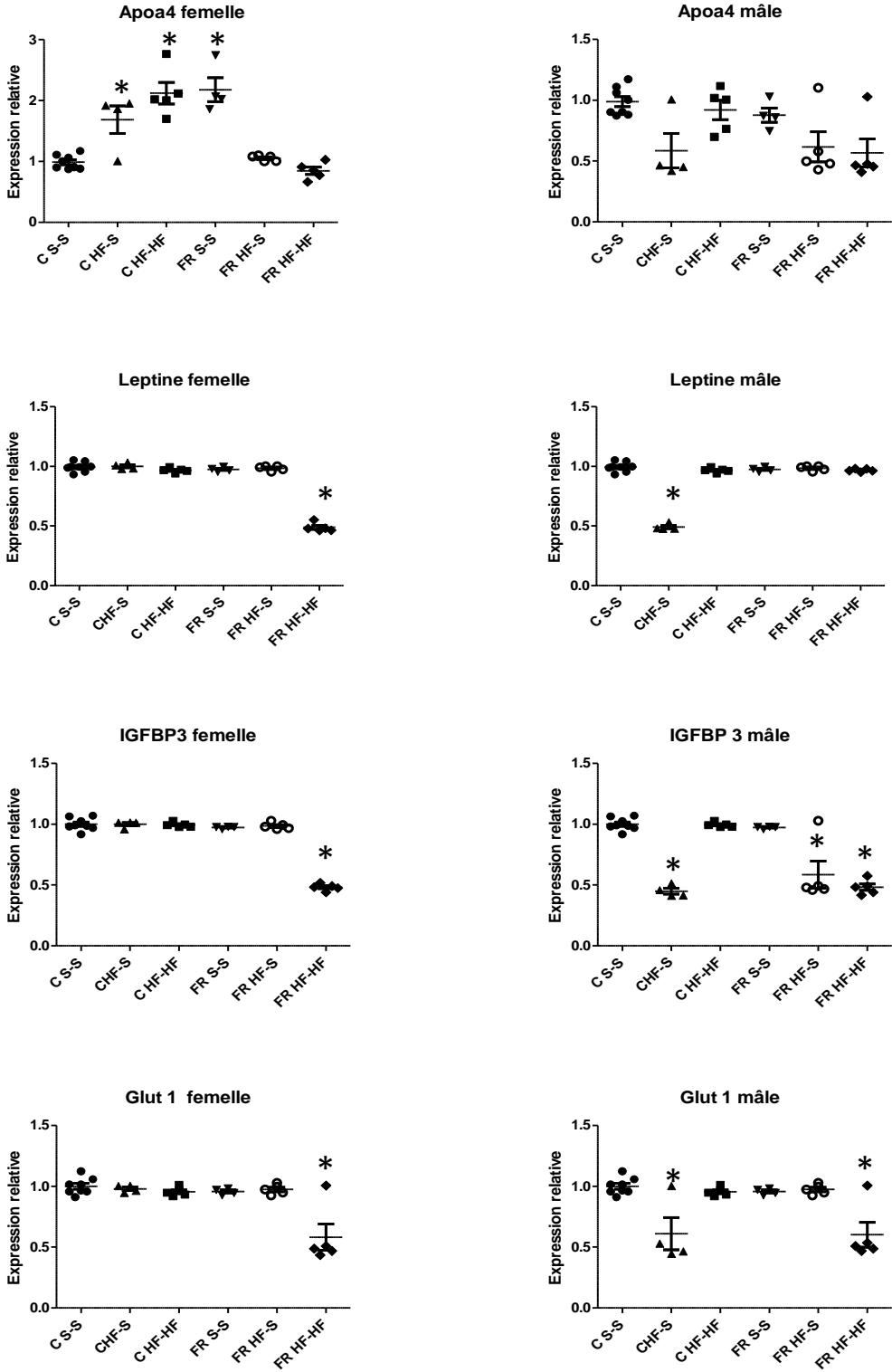


Tableau 2. Paramètres métabolique des mères F1 au partum.

Partum	C			FR		
	C S-S	HF-S	C HF-HF	GFR S-S	GFR HF-S	GFR HF-HF
Glycémie mg/dl	97,17±8,54	89,20±1,95	74,00±11,97	78,83±3,00	70,73±13,12	83,50±36,61
Insulinémie µU/l	9,73±0,87	7,99±1,25	7,93±1,15	9,47±2,26	10,81±1,42	22,49±7,03*†
NEFA mmol/l	0,49±0,09	0,51±0,09	0,68±0,090*	0,45±0,05	0,42±0,17†	0,65±0,09*
TG g/l	1,64±0,26	1,03±0,22	1,80±0,56	1,28±0,02	1,04±0,04 *	0,82±0,06*†
Leptine ng/ml	3,09±0,22	4,02±0,32	8,92±0,56*	5,89±0,22†	5,56±0,22†	7,52±0,36†

Les valeurs représentent la moyenne ±SEM , \*p<0.05 vs C S-S, † p<0.05 vs FR S-S.

Tableau 3. Répartition des macronutriments en fonction du régime alimentaire.

	C			FR		
	S-S	HF-S	HF-HF	S-S	HF-S	HF-HF
<b>Lipides (g/d)</b>	<b>5,70±0,33</b>	<b>5,03±0,39</b>	<b>27,98±2,50***</b>	<b>6,54±0,30</b>	<b>5,39±0,26</b>	<b>24,85±1,50***</b>
<b>Protéines (g/d)</b>	<b>13,45±0,80</b>	<b>11,94±0,93</b>	<b>12,81±1,10</b>	<b>15,50±0,74</b>	<b>12,78±0,62</b>	<b>11,38±0,70*</b>
<b>Hydrates de carbone (g/d)</b>	<b>50,57±3,01</b>	<b>44,77±3,5*</b>	<b>20,27±1,81***</b>	<b>58,16±2,77</b>	<b>47,92±2,33*</b>	<b>18,01±1,11***</b>

Les valeurs représentent la moyenne ±SEM , \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 vs C S-S.

Tableau 4. Analyse phénotypique des nouveau-nés de la génération F2.

	C				FR				
	S-S	HF-S	HF-HF	HF-HF	S-S	HF-S	HF-S	HF-HF	HF-HF
	AGA	AGA	SGA	AGA	AGA	AGA	LGA	SGA	AGA
<b>Poids</b>									
<b>Placenta(g)</b>									
<b>mâle</b>	0,394±0,008	0,401±0,008	0,385±0,014	0,447±0,015*	0,417±0,014	0,401±0,012	0,450±0,015*	0,381±0,012*	0,437±0,013*
<b>femelle</b>	0,384±0,007	0,406±0,008	0,402±0,022	0,454±0,0167*	0,376±0,009	0,390±0,011	0,454±0,022*	0,351±0,009*	0,417±0,012*
<b>F/P ratio</b>									
<b>mâle</b>	12,60±0,28	12,35±0,25	11,54±0,45*	11,04±0,33*	12,06±0,33	12,51±0,37	12,26±0,35	11,70±0,30	11,36±0,33
<b>femelle</b>	10,55±0,87	10,34±0,74	7,407±1,33*	8,982±00,78*	11,36±0,80	10,03±1,12	10,21±1,14	9,063±1,18	9,610±0,85

Les valeurs représentent la moyenne ±SEM , \*p<0.05 vs C S-S.

## Discussion

Selon l'hypothèse de l'origine développementale de la santé et des maladies métaboliques (DOHaD), nos résultats ont démontré qu'une restriction alimentaire de 70 % au cours de la gestation chez le rat entraîne chez la descendance mâle la survenue d'une intolérance au glucose et une hypertension qui sont d'autant plus marquées si les individus sont soumis à un régime obésogène. Nous montrons dans ce travail que la descendance femelle issue de mères sous-alimentées présente une intolérance partielle au glucose qui comme pour la descendance mâle, est accentuée lorsque les femelles ont une alimentation enrichie en graisses. Bien que ces animaux ne développent pas de pathologies avérées, les anomalies métaboliques que l'on observe à l'âge adulte sont programmées au cours du développement fœtal. En revanche, ce régime hyperlipidique riche en acides gras saturés n'entraîne ni surpoids ni obésité, et induit même chez les femelles issues de mères dénutries une baisse de leur masse corporelle. L'absence d'obésité chez nos femelles sous régime hyperlipidique s'explique en partie par le manque d'appétence que présente ce régime. En effet, les graisses contenues dans ce régime sont exclusivement d'origine animale et apportées sous forme de lard, contrairement au régime dit « cafétéria » composé d'aliments appétents et qui renferment non seulement des lipides sous formes AG saturés, mais également des hydrates de carbone et du sel (Bayol et al 2005). Le caractère appétent d'un régime gras est un critère important dans le développement de l'obésité (Bayol et al., 2005).

Les femelles qui consomment ce régime hyperlipidique ont également un apport réduit en hydrates de carbone qui évite la prise de poids excessive chez les femelles C issues de mères contrôles, mais réduit significativement celle des femelles FR issues de mères dénutries. L'obésité chez le rat, consécutive à l'ingestion d'un régime hypergras et appétent est la conséquence non seulement d'une augmentation globale de la prise alimentaire du fait du caractère appétent de ce régime, mais de l'action combinée des hydrates de carbone et des lipides ingérés sur le développement et la fonction des tissus adipeux blancs. Sur le plan métabolique, le régime hyperlipidique chez les femelles contrôles ne perturbe pas la tolérance au glucose, alors qu'il potentialise les troubles de la tolérance au glucose chez les femelles issues de mères dénutries traduisant le fait que leur capacité à sécréter de l'insuline en réponse à une charge orale en glucose est plus basse. Les anomalies de la tolérance au glucose chez les femelles issues de mères dénutries, et en particulier chez celles qui consomment une

alimentation riche en graisses, peuvent s'aggraver pendant la gestation et entraîner l'apparition d'un diabète gestationnel. Dans ce contexte, il s'avère pertinent d'évaluer les conséquences d'un régime hyperlipidique avant et pendant la gestation sur la croissance fœtale, dans le cadre d'un modèle de programmation.

*Le RCIU et la macrosomie seraient ils une conséquence de l'altération du statut métabolique maternel ?*

Au moment de la gestation, les femelles sous régime hyperlipidique ont été divisées en deux groupes : un groupe continuant le régime hyperlipidique, et l'autre recevant un régime standard. Les mères FR donnent naissance à des nouveau-nés de petit poids de naissance traduisant un RCIU. Par contre, la progéniture des mères C qui retrouvent un régime standard pendant la gestation a un poids de naissance normal. En revanche, les femelles FR chez qui on rétablit le régime standard pendant la gestation donnent naissance à des nouveau-nés macrosomes. Le régime hyperlipidique en prégestationnel et maintenu pendant la gestation est donc responsable d'un ralentissement de la croissance fœtale. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par plusieurs études sur les rongeurs et qui montrent qu'un régime hyperlipidique chez la mère administré avant et/ou durant la gestation est responsable d'un retard de croissance chez la descendance (Cerf et al., 2005; Hausman et al., 1991; Tallman and Taylor, 2003). De même, les rattes nourries avec un régime cafétéria (hyperlipidique et forte teneur en sucre) avant et pendant la grossesse avaient des nouveau-nés dont le poids de naissance était fortement diminué (Tallman and Taylor, 2003).

Bien que la majorité des études épidémiologiques indiquent que les femmes ayant un régime alimentaire hyper gras ont un risque élevé d'accoucher de nouveau-nés macrosomes, elles mettent également au monde des enfants présentant un RCIU. Les mères C HF-HF et FR HF-HF présentent au partum des troubles métaboliques qui se caractérisent par une hyperleptinémie et une augmentation des NEFA (acides gras libres) circulants. Chez l'Homme au cours du dernier trimestre de la grossesse, le métabolisme maternel passe de l'anabolisme à un état catabolique, ce qui se traduit par la dégradation accélérée des dépôts graisseux et l'augmentation de l'activité lipolytique dans le tissu adipeux (Coltart and Bateman, 1975). Ce changement est responsable de l'augmentation dans le plasma des acides gras libres que l'on observe durant les dernières semaines de gestation (Benassayag et al., 1997; Benassayag et al., 1999). Chez le rat, l'activité lipolytique du tissu adipeux est aussi augmentée en fin de gestation (Chaves and Herrera, 1978; Freinkel et al., 1970) en rapport

avec l'augmentation de l'expression des ARNm et de l'activité de la lipase hormonosensible qui constitue l'enzyme clé de la cascade lipolytique (Martin-Hidalgo et al., 1994).

Pour expliquer l'hyperleptinémie des femelles C HF-HF nous avons donc quantifié la masse des dépôts adipeux périgonadiques et périrénaux, et déterminer dans chacun de ces tissus l'expression de la leptine. La leptine est synthétisée principalement par le tissu adipeux, son taux plasmatique est positivement corrélé à l'IMC, et une hyperleptinémie associée à une résistance à la leptine est observée en cas d'obésité. Dans notre étude, nous montrons que ni la masse grasse périrénale et périgonadique, ni l'expression du gène de la leptine ne sont augmentés chez ces femelles. L'hyperleptinémie serait dans ce cas liée soit à une augmentation de sa sécrétion, soit à une diminution de son turn over. Ce dernier serait en relation avec une diminution de la captation et/ou des effets de la leptine au niveau des tissus périphériques (Hipmair, et al 2010).

L'hyperleptinémie que l'on rencontre dans la plupart de cas d'obésités a pour origine une réduction du transport de la leptine dans le cerveau. Ce déficit serait lié soit à une altération du mécanisme de transport de la leptine, soit à une diminution de sa captation au niveau du système nerveux central en raison de l'expression accrue de protéines de liaison (Tups et al 2009). Un tel mécanisme a été proposé pour expliquer la résistance à la leptine qui se met en place durant la grossesse (Tups, 2009). Dans ce cas, l'hyperleptinémie s'expliquerait par un mauvais acheminement de la leptine au niveau du SNC et /ou des organes périphériques.

Cependant, les taux plasmatiques de leptine élevés sont également mesurés dans le plasma des femelles FR issues de mères dénutries, sans relation avec leur masse corporelle et ce, quelque soit leur régime alimentaire. Nous avons précédemment montré que ce paramètre métabolique était augmenté dans le plasma des mâles issus de mères dénutries soumis ou non à un régime hyperlipidique (Breton, et al, 2009). Les mécanismes impliqués dans la programmation de cette hyperleptinémie chez des animaux non obèses ne sont pas clairement établis. La leptine est un marqueur de la balance énergétique. Ainsi dans le cas d'un régime hyperlipidique, l'excès d'apport énergétique chronique et l'augmentation de l'énergie disponible au niveau des adipocytes, via des signaux intracellulaires (mTOR, voies des hexosamines), conduit à une production de leptine en agissant non seulement sur la transcription du gène mais également sur la traduction de son ARNm. En revanche, l'état pseudo inflammatoire (cytokinoproinflammatoire, glucocorticoïdes) qui caractérise les animaux FR issus de mères dénutries (Breton, et al, 2009, Mayeur et al., 2010), et dans une moindre mesure ceux qui ont

un régime alimentaire riche en graisses, peut être à l'origine de l'hyperleptinémie présente chez ces animaux. La leptine est sécrétée majoritairement par les adipocytes mais également par d'autres tissus comme le placenta, les muscles squelettiques, les cellules épithéliales mammaires, l'estomac (sécrétion exocrine), et les cellules immunitaires (dans le cas de la réponse inflammatoire).

De même, les femelles issues de mères contrôles et soumises à un régime hyperlipidique en période prégestationnelle ne présentent pas de troubles significatifs de la tolérance au glucose et donnent aussi naissance à des nouveau-nés normotrophes. Ces résultats renforcent l'idée qu'il existe un continuum entre le degré d'hyperglycémie de la mère et l'augmentation du poids de naissance (Metzger et al., 2008). Cependant, la réponse au glucose (OGTT) chez ces femelles n'a pu être évaluée au cours de la gestation, ce qui ne permet pas de tirer une conclusion définitive.

L'absence de corrélation significative entre le métabolisme maternel et la croissance fœtale laisse supposer que l'interface située entre le compartiment et le placenta puisse jouer un rôle déterminant.

### *Importance de la réponse placentaire dans la survenue du RCIU et de macrosomie.*

Une forte corrélation existe entre le poids du placenta et celui du fœtus dans les grossesses non pathologiques (Brusati et al., 2005). Le placenta a un métabolisme complexe, dont les activités endocriniennes et nutritives sont essentielles pour la croissance et la survie de l'enfant. Le ratio poids fœtal / poids placentaire est utilisé pour mesurer l'efficacité du transport des nutriments de la mère au fœtus. Dans les grossesses qui s'accompagnent d'une modification de la croissance fœtale, la masse placentaire ainsi que l'efficacité placentaire sont altérées (Desoye and Shafrir, 1994). La macrosomie est associée à une augmentation du poids et de la taille du placenta (Desoye and Shafrir, 1994; Winick, 1985), tandis le RCIU s'accompagne d'une réduction de la masse placentaire (Hutcheon et al., 2012). Dans cette étude, nous montrons une altération du poids du placenta et du rapport poids fœtal / poids placentaire aussi bien chez les nouveau-nés RCIU que chez les macrosomes.

Jusqu'à présent, les altérations qui se rapportent au poids du placenta et à l'efficacité placentaire ont été observées dans le cas de la dénutrition de la mère ou de l'exposition aux glucocorticoïdes (ie RCIU) ou dans les grossesses compliquées par un diabète (ie



macrosomie) uniquement dans la génération F1. Nous montrons ici que des perturbations placentaires peuvent également apparaître chez des fœtus de la 2<sup>ème</sup> génération.

Les capacités adaptatives du placenta sont de natures différentes : morphologiques, fonctionnelles et moléculaires. Nous n'avons pas réalisé l'analyse morphologique des placentas RCIU macrosomes et normotrophes. Cependant, des données morphologiques indiquent que les placentas de nouveau-nés RCIU obtenus suite à un régime hyperlipidique de la mère présentent une diminution spécifique de la zone labyrinthique (Hayes et al 2012, Retnakaran, et al., 2012) A l'inverse, les placentas de nouveau-nés macrosomes se distinguent par une prolifération de la zone labyrinthique comme le montrent les résultats du modèle N-STZ.

Nous avons focalisé notre étude exclusivement sur les modifications de l'expression génique afin de tenter d'identifier les gènes susceptibles d'être modulés par le régime hyperlipidique de la mère et pouvant être impliqués dans la survenue du RCIU ou de la macrosomie. En particulier, nous avons cherché à déterminer si les altérations placentaires dans le cadre de la programmation fœtale se transmettent à la seconde génération. Cette question se justifie par le fait que, dans notre modèle de dénutrition maternelle à 30%, nous avons mis en évidence dans le placenta des nouveau-nés de la génération F1 une modification du protéome (Mayeur et al., 2013). Cette étude montre qu'une dizaine de protéines sont affectées par la dénutrition maternelle, en particulier celles impliquées dans la défense du stress oxydatif.

L'analyse génique a été réalisée sur 70 gènes impliqués dans diverses fonctions telles que le métabolisme lipidique et glucidique, le transfert de nutriments et l'inflammation et porte sur la zone labyrinthique du placenta. Nos résultats ne montrent pas de dimorphisme sexuel dans l'expression génique dans les placentas mâles et femelles provenant de mères contrôles et nourries avec un régime standard. En revanche, la réponse placentaire dans le cas d'un régime hyperlipidique ou dans le cas de la programmation présente un caractère dimorphique.

Nos résultats montrent que l'expression génique dans les placentas de la génération F2 est fortement modulée par la programmation nutritionnelle, et qu'un grand nombre de gènes sont dérégulés spécifiquement chez le mâle. Le dimorphisme sexuel traduit la différence d'expression d'un gène dans un tissu donné selon le sexe de l'individu. Des données récentes montrent que l'expression génique dans les placentas de souris contrôles présente un dimorphisme sexuel, et que la réponse placentaire à des conditions nutritionnelles, comme un

régime hypercalorique ou un régime low calorique chez la mère, est également différente chez le mâle et chez la femelle (Mao, et al. , 2010)

De même, en réponse au régime hyperlipidique de la mère, les placentas contrôles et FR de la génération F2 présentent un dimorphisme sexuel. Les gènes dont l'expression placentaire est le plus souvent modulé, aussi bien dans les placentas mâles que les placentas femelles, sont ceux appartenant à la famille des angiopoétines (Angptl4, Angptl2, ANGPT2) et des adipocytokines (Adiponectine et AdipoR1, AdipoR2).

L'adiponectine est une hormone adipocytaire impliquée dans le métabolisme glucidique et lipidique avec une activité accrue au niveau des tissus sensibles à l'insuline (Yamauchi and Kadowaki, 2008). L'adiponectine a été retrouvé dans le sang de cordon, et est corrélée positivement au poids de naissance (Mohanty et al., 2009). Celle-ci est fortement sécrétée par le fœtus et le placenta , ce qui suggère que l'adiponectine pourrait jouer un rôle clé dans la croissance fœtale probablement en renforçant l'effet trophique de l'insuline sur les tissus fœtaux et en favorisant la captation périphérique du glucose (Ouchi and Walsh, 2007). Les fortes concentrations d'adiponectine fœtale peuvent être attribuées à l'absence de rétrocontrôle négatif sur la production d'adiponectine, due à un faible pourcentage de graisse corporel chez le fœtus, ou encore une répartition différente des dépôts graisseux chez le nouveau-né (Park et al., 2007) . Chez les fœtus SGA, la forme majoritaire de l'adiponectine est l'isoforme de haut poids moléculaire qui est fortement impliqué dans la sensibilité à l'insuline. La surexpression de cette isoforme pourrait sensibiliser le corps à l'insuline et ainsi préparer le nouveau-né RCIU au rattrapage de sa courbe de croissance dit « catch up ». On peut noter que le taux d'adiponectine chez les enfants RCIU était particulièrement bas chez ceux qui avaient rattrapé leur courbe de croissance comparés aux enfants RCIU qui sont restés petits durant leur enfance (Luo, et al., 2012). Les deux isoformes R1 et R2 sont activés par la forme globulaire et entière de l'adiponectine et vont alors stimuler la voie de l'AMPC. Le récepteur R1 à l'adiponectine a une forte affinité pour la forme globulaire et longue de l'adiponectine. Le récepteur 2 à l'adiponectine a une affinité moyenne pour la forme globulaire et longue. Une surexpression des récepteurs R1 et R2 entraînent une résistance à l'insuline et une forte intolérance au glucose.

Le récepteur 2 de l'adiponectine est localisé au niveau du placenta chez le rat et l'Homme. Dans un modèle de dénutrition calorique à 30%, l'ARNm de l'adiponectine est diminuée

après 16 jours de restriction alors que l'expression du récepteur 2 : adipo R2 reste inchangée (Weigert et al., 2010).

Dans notre modèle, nous observons une modification de l'expression du système adiponectine qui se traduit par une surexpression de l'adiponectine uniquement dans les placentas des mâles issus de mères FR HF-S, ou surexpression du récepteur adipoR2 dans les placentas de nouveau-nés issus de mères C et FR sous régime hyperlipidique (FR HF-HF, C HF-HF) et une surexpression du récepteur adipoR1 dans les placentas de nouveau-nés issus de femelles dénutries (FR S-S). Le système adiponectine est surexprimé dans les placentas mâles de la F2 issus de la programmation fœtale. Le régime hyperlipidique chez les mères C et FR entraîne également une surexpression génique de l'adiponectine. Cependant, ces niveaux d'expression ne sont pas en rapport avec les modifications de la croissance fœtale. Les résultats suggèrent que le système adiponectine dans le placenta est sensible au statut nutritionnel de la mère, mais ne semble pas impliqués dans la survenue de RCIU ou de macrosomie.

Le système « angiopoétine » est également différenciellement exprimé dans les placentas en réponse à un régime HF ou en réponse à la programmation. Ce système est connu pour réguler le métabolisme lipidique, et joue un rôle dans l'inflammation du tissu adipeux. En effet, les angiopoétinlike protéine contrôlent l'activité des différentes lipoprotéines lipase présentes non seulement dans le tissu adipeux, mais aussi au niveau des autres organes impliqués dans le métabolisme lipidique. A ce jour, 7 isoformes ont été identifiés (angiopoétinlike 1 à 7). La délétion de l'angiopoétinlike 2 chez la souris améliore l'état de l'inflammation du tissu adipeux et la résistance à l'insuline chez la souris obèse. À l'inverse, une surexpression de l'angiopoétinlike 2 entraîne une augmentation de l'inflammation tissulaire et une résistance à l'insuline (Hato et al., 2008). Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle d'évidence que l'angiopoétinlike 2 soit impliquée dans l'homéostasie lipidique. En revanche, les études sur des souris transgéniques montrent que l'angiopoétinlike 4 joue un rôle déterminant dans le métabolisme des TGs plasmatiques. Les souris déficientes en angiopoétinlike 4 ont des taux de TGs plasmatiques bas et une activité LPL tissulaire élevée. L'inhibition de l'activité enzymatique de la LPL par l'angiopoétinlike 4 est due à la conversion de la forme dimérique active de la LPL en sa forme monomère inactive. L'expression de l'angiopoétinlike 4 est régulée par de nombreux signaux comme le PPAR $\alpha$  dans le foie, et le PPAR $\gamma$  dans le tissu adipeux (Kersten, 2005). L'expression de l'angiopoétinlike 4 est fortement induite par les acides gras libres dans une variété de tissus. Chez l'Homme, l'angiopoétinlike 4 est stimulée par l'augmentation des acides gras, par le jeûne et la restriction calorique prolongée (Patsouris

et al., 2006). Contrairement à l'angiopoétinlike 4, il n'y a pas d'évidence que l'angiopoétinlike 2 régule le taux de lipides plasmatiques. Il existe très peu de données sur le rôle exercé par les angiopoétinlike protéine au niveau du placenta. La modulation de l'expression placentaire du système angiopoétinlike protéine que l'on observe dans les placentas contrôles et FR en réponse au régime hyperlipidique montre que ces protéines peuvent également jouer un rôle dans le métabolisme des lipides en plus de leur fonction dans l'implantation du placenta (Josephs, et al. 2007, Romero, et al., 2009).

## CONCLUSION

Ce travail a permis de démontrer qu'un régime hyperlipidique chez la mère, sans pour autant perturber significativement le métabolisme lipidique et glucidique, module l'expression génique placentaire et devient délétère pour le fœtus (ie RCIU) si celui-ci est maintenu pendant la gestation. En outre, si la mère a été elle-même exposée au cours de sa vie embryonnaire à un stress maternel d'origine nutritionnelle, comme ici une dénutrition calorique (modèle FR30), dans ce cas, le régime hyperlipidique induit des altérations du métabolisme énergétique, et son impact sur la croissance fœtale (RCIU) est beaucoup plus prononcé. En revanche, si le régime alimentaire hyperlipidique de la mère est évité pendant la gestation, le développement du fœtus se trouve malgré tout altéré puisque la majorité des nouveau-nés sont macrosomes et l'expression des gènes placentaires est modifiée. L'ensemble de ces données montre clairement que la croissance fœtale va dépendre avant tout du « dialogue » qui s'établit entre le métabolisme maternel, la fonction placentaire et les signaux en provenance du fœtus. Ainsi, on peut supposer que le placenta élabore des réponses adaptatives différentes qui permettent d'optimiser la survie du fœtus et qui de ce fait peuvent aboutir soit à des phénotypes semblables, cas du RCIU chez les mères C et FR sous régime hyperlipidique avant la conception et pendant la gestation, soit à des phénotypes opposés comme dans le cas de la macrosomie vs RCIU chez les mères FR selon que leur régime hyperlipidique en préconceptionnel soit poursuivi ou non pendant la gestation. Cette hypothèse, si elle se confirme, suppose que les capacités d'adaptation du placenta qui sont présentes dans les grossesses normales ou pathologiques, qu'elles soient morphologiques, fonctionnelles ou moléculaires, et qui s'accompagnent d'anomalies de la croissance fœtale, ne sont probablement pas uniformes. L'analyse de l'expression des gènes placentaires plaide en faveur de cette hypothèse.

En accord avec un nombre de plus en plus croissant de données de la littérature, nous montrons que la réponse adaptative du placenta à l'environnement intra utérin est différente chez le mâle et chez la femelle. Le caractère dimorphique de l'expression génique placentaire pourrait être à l'origine des profils pathologiques différents qui sont couramment décrits dans le cadre de la programmation des maladies métaboliques de l'adulte.

En conséquence, la recherche de marqueurs placentaires prédictifs du RCIU ou de la macrosomie s'avère beaucoup plus complexe qu'il n'apparaît.

# Références

**-A-**

Alcolado, J.C., and Thomas, A.W. (1995). Maternally inherited diabetes mellitus: the role of mitochondrial DNA defects. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 12, 102-108.

Alcolado, R., Gagg, J., Thomas, A.W., Sherratt, E.J., and Alcolado, J.C. (1995). Testing parents of NIDDM patients. *Diabetologia* 38, 1482-1483.

Aldoretta, P.W., and Hay, W.W., Jr. (1995). Metabolic substrates for fetal energy metabolism and growth. *Clinics in perinatology* 22, 15-36.

Allen, W.R., Wilsher, S., Turnbull, C., Stewart, F., Ousey, J., Rossdale, P.D., and Fowden, A.L. (2002). Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* 123, 445-453.

**-B-**

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.

Barker, D.J. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *Bmj* 301, 1111.

Battista, M.C., Hivert, M.F., Duval, K., and Baillargeon, J.P. (2011). Intergenerational cycle of obesity and diabetes: how can we reduce the burdens of these conditions on the health of future generations? *Experimental diabetes research* 2011, 596060.

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. *The Journal of physiology* 567, 951-961.

Belkacemi, L., Chen, C.H., Ross, M.G., and Desai, M. (2009). Increased placental apoptosis in maternal food restricted gestations: role of the Fas pathway. *Placenta* 30, 739-751.

- Benassayag, C., Mignot, T.M., Haourigui, M., Civel, C., Hassid, J., Carbonne, B., Nunez, E.A., and Ferre, F. (1997). High polyunsaturated fatty acid, thromboxane A<sub>2</sub>, and alpha-fetoprotein concentrations at the human fetomaternal interface. *Journal of lipid research* 38, 276-286.
- Benassayag, C., Rigourd, V., Mignot, T.M., Hassid, J., Leroy, M.J., Robert, B., Civel, C., Grange, G., Dallot, E., Tanguy, J., Nunez, E.A., and Ferre, F. (1999). Does high polyunsaturated free fatty acid level at the fetomaternal interface alter steroid hormone message during pregnancy? *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 60, 393-399.
- Bergman, R.N., Stefanovski, D., Buchanan, T.A., Sumner, A.E., Reynolds, J.C., Sebring, N.G., Xiang, A.H., and Watanabe, R.M. (2011). A better index of body adiposity. *Obesity (Silver Spring)* 19, 1083-1089.
- Bertin, E., Gangnerau, M.N., Bellon, G., Bailbe, 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. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 283, R623-630.
- Biddinger, S.B., Almind, K., Miyazaki, M., Kokkotou, E., Ntambi, J.M., and Kahn, C.R. (2005). Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes* 54, 1314-1323.
- Bieswal F, Ahn MT, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, Remacle C.(2006). The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)*. Aug;14(8):1330-43.
- 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.



- Bogdarina, I., Murphy, H.C., Burns, S.P., and Clark, A.J. (2004). Investigation of the role of epigenetic modification of the rat glucokinase gene in fetal programming. *Life sciences* 74, 1407-1415.
- Bol VV, Delattre AI, Reusens B, Raes M, 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*. Aug;297(2):R291-9.
- Bolzan, A.D., and Bianchi, M.S. (2001). Genotoxicity of streptonigrin: a review. *Mutation research* 488, 25-37.
- Breton, C., Lukaszewski, M.A., Risold, P.Y., Enache, M., Guillemot, J., Riviere, G., Delahaye, F., Lesage, J., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., and Vieau, D. (2009). 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* 296, E462-472.
- Brusati, V., Jozwik, M., Teng, C., Paolini, C., Marconi, A.M., and Battaglia, F.C. (2005). Fetal and maternal non-glucose carbohydrates and polyols concentrations in normal human pregnancies at term. *Pediatric research* 58, 700-704.
- Buchanan, T.A., Xiang, A., Kjos, S.L., and Watanabe, R. (2007). What is gestational diabetes? *Diabetes care* 30 Suppl 2, S105-111.
- Buckley, A.J., Jaquiery, A.L., and Harding, J.E. (2005a). Nutritional programming of adult disease. *Cell and tissue research* 322, 73-79.
- Buckley, A.J., Keseru, B., Briody, J., Thompson, M., Ozanne, S.E., and Thompson, C.H. (2005b). Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism: clinical and experimental* 54, 500-507.
- Burdge, G.C., Slater-Jefferies, J., Torrens, C., Phillips, E.S., Hanson, M.A., and Lillycrop, K.A. (2007). Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *The British journal of nutrition* 97, 435-439.

Burdge GC, Hoile SP, Uller T, Thomas NA, Gluckman PD, Hanson MA, Lillycrop KA. (2011). Progressive, transgenerational changes in offspring phenotype and epigenotype following nutritional transition. *PLoS One*. 2011;6(11):e28282.

**-C-**

Catalano, P.M., Thomas, A., Huston-Presley, L., and Amini, S.B. (2003). Increased fetal adiposity: a very sensitive marker of abnormal in utero development. *American journal of obstetrics and gynecology* 189, 1698-1704.

Cerf, M.E., Williams, K., Nkomo, X.I., Muller, C.J., Du Toit, D.F., Louw, J., and Wolfe-Coote, S.A. (2005). Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288, R1122-1128.

Charalambous, M., Cowley, M., Geoghegan, F., Smith, F.M., Radford, E.J., Marlow, B.P., Graham, C.F., Hurst, L.D., and Ward, A. (2010). Maternally-inherited Grb10 reduces placental size and efficiency. *Developmental biology* 337, 1-8.

Chaves, J.M., and Herrera, E. (1978). In vitro glycerol metabolism in adipose tissue from fasted pregnant rats. *Biochemical and biophysical research communications* 85, 1299-1306.

Coan, P.M., Burton, G.J., and Ferguson-Smith, A.C. (2005). Imprinted genes in the placenta--a review. *Placenta* 26 Suppl A, S10-20.

Coltart, T.M., and Bateman, C. (1975). Carbohydrate-induced lipogenesis in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *British journal of obstetrics and gynaecology* 82, 471-475.

Conrad, D.F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., Aerts, J., Andrews, T.D., Barnes, C., Campbell, P., Fitzgerald, T., Hu, M., Ihm, C.H., Kristiansson, K., Macarthur, D.G., Macdonald, J.R., Onyiah, I., Pang, A.W., Robson, S., Stirrups, K., Valsesia, A., Walter, K., Wei, J., Wellcome Trust Case Control, C., Tyler-Smith, C., Carter, N.P., Lee, C., Scherer,

S.W., and Hurles, M.E. (2010). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464, 704-712.

Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W.(2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. Jun 27;417(6892):945-8

Cross, J.A., Brennan, C., Gray, T., Temple, R.C., Dozio, N., Hughes, J.C., Levell, N.J., Murphy, H., Fowler, D., Hughes, D.A., and Sampson, M.J. (2009). Absence of telomere shortening and oxidative DNA damage in the young adult offspring of women with pre-gestational type 1 diabetes. *Diabetologia* 52, 226-234.

Crossley, J.R., and Upsdell, M. (1980). The incidence of juvenile diabetes mellitus in New Zealand. *Diabetologia* 18, 29-34.

Cui, W., Ma, C.X., Tang, Y., Chang, V., Rao, P.V., Ariet, M., Resnick, M.B., and Roth, J. (2005). Sex differences in birth defects: a study of opposite-sex twins. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 73, 876-880.

## -D-

Dabelea, D. (2007). The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes care* 30 Suppl 2, S169-174.

Dabelea, D., Hanson, R.L., Bennett, P.H., Roumain, J., Knowler, W.C., and Pettitt, D.J. (1998). Increasing prevalence of Type II diabetes in American Indian children. *Diabetologia* 41, 904-910.

Dabelea, D., and Pettitt, D.J. (2001). Intrauterine diabetic environment confers risks for type 2 diabetes mellitus and obesity in the offspring, in addition to genetic susceptibility. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 14, 1085-1091.

- Dalfrà, M.G., Busetto, L., Chillelli, N.C., and Lapolla, A. (2012). Pregnancy and foetal outcome after bariatric surgery: a review of recent studies. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 25, 1537-1543.
- 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., Rao, M., Ali, M.K., Riley, L.M., Robinson, C.A., Ezzati, M., and Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating, G. (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.
- 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.
- Desoye, G., and Shafir, E. (1994). Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. *Molecular aspects of medicine* 15, 505-682.
- Doherty, C.B., Lewis, R.M., Sharkey, A., and Burton, G.J. (2003). Placental composition and surface area but not vascularization are altered by maternal protein restriction in the rat. *Placenta* 24, 34-38.
- Dunn, G.A., Morgan, C.P., and Bale, T.L. (2011). Sex-specificity in transgenerational epigenetic programming. *Hormones and behavior* 59, 290-295.
- Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A.U., Wheeler, E., Glazer, N.L., Bouatia-Naji, N., Gloyn, A.L., Lindgren, C.M., Magi, R., Morris, A.P., Randall, J., Johnson, T., Elliott, P., Rybin, D., Thorleifsson, G., Steinthorsdottir, V., Henneman, P., Grallert, H., Dehghan, A., Hottenga, J.J., Franklin, C.S., Navarro, P., Song, K., Goel, A., Perry, J.R., Egan, J.M., Lajunen, T., Grarup, N., Sparso, T., Doney, A., Voight, B.F., Stringham, H.M., Li, M., Kanoni, S., Shrader, P., Cavalcanti-Proenca, C., Kumari, M., Qi, L., Timpson, N.J., Gieger, C., Zabena, C., Rocheleau, G., Ingelsson, E., An, P., O'Connell, J., Luan, J., Elliott, A., McCarroll, S.A., Payne, F., Roccascocca, R.M., Pattou, F., Sethupathy, P.,

Ardlie, K., Ariyurek, Y., Balkau, B., Barter, P., Beilby, J.P., Ben-Shlomo, Y., Benediktsson, R., Bennett, A.J., Bergmann, S., Bochud, M., Boerwinkle, E., Bonnefond, A., Bonnycastle, L.L., Borch-Johnsen, K., Bottcher, Y., Brunner, E., Bumpstead, S.J., Charpentier, G., Chen, Y.D., Chines, P., Clarke, R., Coin, L.J., Cooper, M.N., Cornelis, M., Crawford, G., Crisponi, L., Day, I.N., de Geus, E.J., Delplanque, J., Dina, C., Erdos, M.R., Fedson, A.C., Fischer-Rosinsky, A., Forouhi, N.G., Fox, C.S., Frants, R., Franzosi, M.G., Galan, P., Goodarzi, M.O., Graessler, J., Groves, C.J., Grundy, S., Gwilliam, R., Gyllensten, U., Hadjadj, S., Hallmans, G., Hammond, N., Han, X., Hartikainen, A.L., Hassanali, N., Hayward, C., Heath, S.C., Hercberg, S., Herder, C., Hicks, A.A., Hillman, D.R., Hingorani, A.D., Hofman, A., Hui, J., Hung, J., Isomaa, B., Johnson, P.R., Jorgensen, T., Jula, A., Kaakinen, M., Kaprio, J., Kesaniemi, Y.A., Kivimaki, M., Knight, B., Koskinen, S., Kovacs, P., Kyvik, K.O., Lathrop, G.M., Lawlor, D.A., Le Bacquer, O., Lecoeur, C., Li, Y., Lyssenko, V., Mahley, R., Mangino, M., Manning, A.K., Martinez-Larrad, M.T., McAteer, J.B., McCulloch, L.J., McPherson, R., Meisinger, C., Melzer, D., Meyre, D., Mitchell, B.D., Morken, M.A., Mukherjee, S., Naitza, S., Narisu, N., Neville, M.J., Oostra, B.A., Orru, M., Pakyz, R., Palmer, C.N., Paolisso, G., Pattaro, C., Pearson, D., Peden, J.F., Pedersen, N.L., Perola, M., Pfeiffer, A.F., Pichler, I., Polasek, O., Posthuma, D., Potter, S.C., Pouta, A., Province, M.A., Psaty, B.M., Rathmann, W., Rayner, N.W., Rice, K., Ripatti, S., Rivadeneira, F., Roden, M., Rolandsson, O., Sandbaek, A., Sandhu, M., Sanna, S., Sayer, A.A., Scheet, P., Scott, L.J., Seedorf, U., Sharp, S.J., Shields, B., Sigurethsson, G., Sijbrands, E.J., Silveira, A., Simpson, L., Singleton, A., Smith, N.L., Sovio, U., Swift, A., Syddall, H., Syvanen, A.C., Tanaka, T., Thorand, B., Tichet, J., Tonjes, A., Tuomi, T., Uitterlinden, A.G., van Dijk, K.W., van Hoek, M., Varma, D., Visvikis-Siest, S., Vitart, V., Vogelzangs, N., Waeber, G., Wagner, P.J., Walley, A., Walters, G.B., Ward, K.L., Watkins, H., Weedon, M.N., Wild, S.H., Willemsen, G., Witteman, J.C., Yarnell, J.W., Zeggini, E., Zelenika, D., Zethelius, B., Zhai, G., Zhao, J.H., Zillikens, M.C., Borecki, I.B., Loos, R.J., Meneton, P., Magnusson, P.K., Nathan, D.M., Williams, G.H., Hattersley, A.T., Silander, K., Salomaa, V., Smith, G.D., Bornstein, S.R., Schwarz, P., Spranger, J., Karpe, F., Shuldiner, A.R., Cooper, C., Dedoussis, G.V., Serrano-Rios, M., Morris, A.D., Lind, L., Palmer, L.J., Hu, F.B., Franks, P.W., Ebrahim, S., Marmot, M., Kao, W.H., Pankow, J.S., Sampson, M.J., Kuusisto, J., Laakso, M., Hansen, T., Pedersen, O., Pramstaller, P.P., Wichmann, H.E., Illig, T., Rudan, I., Wright, A.F., Stumvoll, M., Campbell, H., Wilson, J.F., Bergman, R.N., Buchanan, T.A., Collins, F.S., Mohlke, K.L., Tuomilehto, J., Valle, T.T., Altshuler, D., Rotter, J.I., Siscovick, D.S., Penninx, B.W., Boomsma, D.I., Deloukas, P., Spector, T.D., Frayling, T.M., Ferrucci, L., Kong, A.,

Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., van Duijn, C.M., Aulchenko, Y.S., Cao, A., Scuteri, A., Schlessinger, D., Uda, M., Ruukonen, A., Jarvelin, M.R., Waterworth, D.M., Vollenweider, P., Peltonen, L., Mooser, V., Abecasis, G.R., Wareham, N.J., Sladek, R., Froguel, P., Watanabe, R.M., Meigs, J.B., Groop, L., Boehnke, M., McCarthy, M.I., Florez, J.C., and Barroso, I. (2010). New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nature genetics* 42, 105-116.

Dumortier O, Blondeau B, Duvillié B, Reusens B, Bréant B, Remacle C. (2007). Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia*. Dec;50(12):2495-503.

**-E-**

Elmes MJ, Haase A, Gardner DS, Langley-Evans SC. (2009). Sex differences in sensitivity to beta-adrenergic agonist isoproterenol in the isolated adult rat heart following prenatal protein restriction. *Br J Nutr*. Mar;101(5):725-34.

Ehrenberg, H.M., Durnwald, C.P., Catalano, P., and Mercer, B.M. (2004). The influence of obesity and diabetes on the risk of cesarean delivery. *American journal of obstetrics and gynecology* 191, 969-974.

Even, P.C., Bertin, E., Gangnerau, M.N., Roseau, S., Tome, D., and Portha, B. (2003). Energy restriction with protein restriction increases basal metabolism and meal-induced thermogenesis in rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 284, R751-759.

**-F-**

- Forbes, J.M., and Cooper, M.E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews* 93, 137-188.
- Fountain, E.D., Mao, J., Whyte, J.J., Mueller, K.E., Ellersieck, M.R., Will, M.J., Roberts, R.M., Macdonald, R., and Rosenfeld, C.S. (2008). Effects of diets enriched in omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on offspring sex-ratio and maternal behavior in mice. *Biology of reproduction* 78, 211-217.
- Fowden, A.L. (1995). Endocrine regulation of fetal growth. *Reproduction, fertility, and development* 7, 351-363.
- Fowden, A.L., and Comline, R.S. (1984). The effects of pancreatectomy on the sheep fetus in utero. *Quarterly journal of experimental physiology* 69, 319-330.
- Fowden, A.L., Comline, R.S., and Silver, M. (1984). Insulin secretion and carbohydrate metabolism during pregnancy in the mare. *Equine veterinary journal* 16, 239-246.
- Fowden, A.L., and Silver, M. (1995). Glucose and oxygen metabolism in the fetal foal during late gestation. *The American journal of physiology* 269, R1455-1461.
- Freinkel, N., Herrera, E., Knopp, R.H., and Ruder, H.J. (1970). Metabolic realignments in late pregnancy: a clue to diabetogenesis. *Advances in metabolic disorders* 1, Suppl 1:205+.
- Friedlander, Y., Paltiel, O., Deutsch, L., Knaanie, A., Massalha, S., Tiram, E., and Harlap, S. (2003). Birthweight and relationship with infant, child and adult mortality in the Jerusalem perinatal study. *Paediatric and perinatal epidemiology* 17, 398-406.
- Froen, J.F., Gardosi, J.O., Thurmann, A., Francis, A., and Stray-Pedersen, B. (2004). Restricted fetal growth in sudden intrauterine unexplained death. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 83, 801-807.

**-G-**

Gabory, A., Ferry, L., Fajardy, I., Jouneau, L., Gothie, J.D., Vige, A., Fleur, C., Mayeur, S., Gallou-Kabani, C., Gross, M.S., Attig, L., Vambergue, A., Lesage, J., Reusens, B., Vieau, D., Remacle, C., Jais, J.P., and Junien, C. (2012). Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PloS one* 7, e47986.

Garg N, Thakur S, McMahan CA, Adamo ML.(2011). High fat diet induced insulin resistance and glucose intolerance are gender-specific in IGF-1R heterozygous mice. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 30;413(3):476-80.

Gauguier, D., Froguel, P., Parent, V., Bernard, C., Bihoreau, M.T., Portha, B., James, M.R., Penicaud, L., Lathrop, M., and Ktorza, A. (1996). Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nature genetics* 12, 38-43.

Gebert, C., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Groger, D., Thiel, J., Reinhardt, R., Lehrach, H., Hajkova, P., Lucas-Hahn, A., Carnwath, J.W., and Niemann, H. (2009). DNA methylation in the IGF2 intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. *Genomics* 94, 63-69.

Georgiades, P., Ferguson-Smith, A.C., and Burton, G.J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23, 3-19.

Gill-Randall, R., Adams, D., Ollerton, R.L., Lewis, M., and Alcolado, J.C. (2004). Type 2 diabetes mellitus--genes or intrauterine environment? An embryo transfer paradigm in rats. *Diabetologia* 47, 1354-1359.

Gudmundsson, J., Sulem, P., Steinthorsdottir, V., Bergthorsson, J.T., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Rafnar, T., Gudbjartsson, D., Agnarsson, B.A., Baker, A., Sigurdsson, A., Benediktsson, K.R., Jakobsdottir, M., Blondal, T., Stacey, S.N., Helgason, A., Gunnarsdottir, S., Olafsdottir, A., Kristinsson, K.T., Birgisdottir, B., Ghosh, S., Thorlacius, S., Magnusdottir, D., Stefansdottir, G., Kristjansson, K., Bagger, Y., Wilensky, R.L., Reilly, M.P., Morris, A.D.,



Kimber, C.H., Adeyemo, A., Chen, Y., Zhou, J., So, W.Y., Tong, P.C., Ng, M.C., Hansen, T., Andersen, G., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Tres, A., Fuertes, F., Ruiz-Echarri, M., Asin, L., Saez, B., van Boven, E., Klaver, S., Swinkels, D.W., Aben, K.K., Graif, T., Cashy, J., Suarez, B.K., van Vierssen Trip, O., Frigge, M.L., Ober, C., Hofker, M.H., Wijmenga, C., Christiansen, C., Rader, D.J., Palmer, C.N., Rotimi, C., Chan, J.C., Pedersen, O., Sigurdsson, G., Benediktsson, R., Jonsson, E., Einarsson, G.V., Mayordomo, J.I., Catalona, W.J., Kiemeny, L.A., Barkardottir, R.B., Gulcher, J.R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., and Stefansson, K. (2007). Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nature genetics* 39, 977-983.

### **-H-**

Haggarty, P. (2002). Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth--a review. *Placenta* 23 Suppl A, S28-38.

Haggarty, P., Allstaff, S., Hoad, G., Ashton, J., and Abramovich, D.R. (2002). Placental nutrient transfer capacity and fetal growth. *Placenta* 23, 86-92.

Hales, C.N., Barker, D.J., Clark, P.M., Cox, L.J., Fall, C., Osmond, C., and Winter, P.D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 303, 1019-1022.

Hato, T., Tabata, M., and Oike, Y. (2008). The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends in cardiovascular medicine* 18, 6-14.

Hausman, D.B., Seerley, R.W., and Martin, R.J. (1991). Effect of excess dietary fat during the third trimester of pregnancy on maternal, placental, and fetal metabolism in the pig. *Biology of the neonate* 59, 257-267.

Hay, W.W., Jr. (1995). Regulation of placental metabolism by glucose supply. *Reproduction, fertility, and development* 7, 365-375.

Hendrix, D., and Hasman, L. (2008). A survey of collection development for United States Medical Licensing Examination (USMLE) and National Board Dental Examination (NBDE) preparation material. *Journal of the Medical Library Association : JMLA* 96, 207-216.

Henriksen, E.J., Diamond-Stanic, M.K., and Marchionne, E.M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free radical biology & medicine* 51, 993-999.

Hidden, U., Glitzner, E., Hartmann, M., and Desoye, G. (2009a). Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *Journal of anatomy* 215, 60-68.

Hidden, U., Lang, I., Ghaffari-Tabrizi, N., Gauster, M., Lang, U., and Desoye, G. (2009b). Insulin action on the human placental endothelium in normal and diabetic pregnancy. *Current vascular pharmacology* 7, 460-466.

Hoppe CC, Evans RG, Bertram JF, Moritz KM.(2007). Effects of dietary protein restriction on nephron number in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. May;292(5):R1768-74

Howie, G.J., Sloboda, D.M., and Vickers, M.H. (2012). Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *The British journal of nutrition* 108, 298-307.

Hu, F.B. (2003). Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *Lipids* 38, 103-108.

Hutcheon, J.A., McNamara, H., Platt, R.W., Benjamin, A., and Kramer, M.S. (2012). Placental weight for gestational age and adverse perinatal outcomes. *Obstetrics and gynecology* 119, 1251-1258.

**-J-**

Janghorbani, M., Momeni, F., and Dehghani, M. (2012). Hip circumference, height and risk of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 13, 1172-1181.

Jansson, N., Greenwood, S.L., Johansson, B.R., Powell, T.L., and Jansson, T. (2003a). Leptin stimulates the activity of the system A amino acid transporter in human placental villous fragments. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 1205-1211.

Jansson, T., Wennergren, M., and Powell, T. (2003b). [Pregnancy complications can impair placental transport systems. Aberrant fetal growth, for example in diabetes, is only now beginning to be understood]. *Lakartidningen* 100, 2508-2511.

Jimenez-Chillaron, J.C., Isganaitis, E., Charalambous, M., Gesta, S., Pentinat-Pelegrin, T., Faucette, R.R., Otis, J.P., Chow, A., Diaz, R., Ferguson-Smith, A., and Patti, M.E. (2009). Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes* 58, 460-468.

Jones, H.N., Powell, T.L., and Jansson, T. (2007). Regulation of placental nutrient transport--a review. *Placenta* 28, 763-774.

Junien, C., Gabory, A., and Attig, L. (2012). [Sexual dimorphism in the XXI(st) century]. *Medecine sciences : M/S* 28, 185-192.

### **-K-**

Kabiru, W., and Raynor, B.D. (2004). Obstetric outcomes associated with increase in BMI category during pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology* 191, 928-932.

Kasiske, B.L., O'Donnell, M.P., and Keane, W.F. (1992). The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 19, 110-115.

Kersten, S. (2005). Regulation of lipid metabolism via angiopoietin-like proteins. *Biochemical Society transactions* 33, 1059-1062.

Klauwer, D., Blum, W.F., Hanitsch, S., Rascher, W., Lee, P.D., and Kiess, W. (1997). IGF-I, IGF-II, free IGF-I and IGFBP-1, -2 and -3 levels in venous cord blood: relationship to birthweight, length and gestational age in healthy newborns. *Acta paediatrica* 86, 826-833.

Kobberling, J., and Rotenberger, J. (1992). Problems in evaluating dose equivalences of glucocorticoids. *International journal of clinical pharmacology, therapy, and toxicology* 30, 434-436.

Koskenvuo, M., Kaprio, J., and Romanov, K. (1992). Twin studies in metabolic diseases. *Annals of medicine* 24, 379-381.

Krishnaveni, G.V., Veena, S.R., Hill, J.C., Kehoe, S., Karat, S.C., and Fall, C.H. (2010a). Intrauterine exposure to maternal diabetes is associated with higher adiposity and insulin resistance and clustering of cardiovascular risk markers in Indian children. *Diabetes care* 33, 402-404.

Krishnaveni, G.V., Veena, S.R., Wills, A.K., Hill, J.C., Karat, S.C., and Fall, C.H. (2010b). Adiposity, insulin resistance and cardiovascular risk factors in 9-10-year-old Indian children: relationships with birth size and postnatal growth. *Journal of developmental origins of health and disease* 1, 403-411.

Kyle, U.G., and Pichard, C. (2006). The Dutch Famine of 1944-1945: a pathophysiological model of long-term consequences of wasting disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 9, 388-394.

**-L-**

Langley-Evans, S., and Jackson, A. (1996a). Intrauterine programming of hypertension: nutrient-hormone interactions. *Nutrition reviews* 54, 163-169.

Langley-Evans, S.C., and Jackson, A.A. (1996b). Rats with hypertension induced by in utero exposure to maternal low-protein diets fail to increase blood pressure in response to a high salt intake. *Annals of nutrition & metabolism* 40, 1-9.

- Lapillonne, A., Guerin, S., Braillon, P., Claris, O., Delmas, P.D., and Salle, B.L. (1997). Diabetes during pregnancy does not alter whole body bone mineral content in infants. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 3993-3997.
- Lepercq, J., Taupin, P., Dubois-Laforgue, D., Duranteau, L., Lahlou, N., Boitard, C., Landais, P., Hauguel-De Mouzon, S., and Timsit, J. (2001). Heterogeneity of fetal growth in type 1 diabetic pregnancy. *Diabetes & metabolism* 27, 339-344.
- Lindegaard, M.L., Damm, P., Mathiesen, E.R., and Nielsen, L.B. (2006). Placental triglyceride accumulation in maternal type 1 diabetes is associated with increased lipase gene expression. *Journal of lipid research* 47, 2581-2588.
- Lindstrom, P. (2007). The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *TheScientificWorldJournal* 7, 666-685.
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.
- Lukaszewski, M.A., Mayeur, S., Fajardy, I., Delahaye, F., Dutriez-Casteloot, I., Montel, V., Dickes-Coopman, A., Laborie, C., Lesage, J., Vieau, D., and Breton, C. (2011). Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 301, E548-559.

## -M-

- Malassine, A., Frenzo, J.L., and Evain-Brion, D. (2003). A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human reproduction update* 9, 531-539.
- Martin-Hidalgo, A., Holm, C., Belfrage, P., Schotz, M.C., and Herrera, E. (1994). Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. *The American journal of physiology* 266, E930-935.

- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., and Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47, 224-229.
- Mathers, C. (1995). Mortality patterns of urban, rural and remote populations in northern Australia. *People and place* 3, 15-24.
- Mathews, F., Johnson, P.J., and Neil, A. (2008). You are what your mother eats: evidence for maternal preconception diet influencing foetal sex in humans. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 275, 1661-1668.
- Mayeur, S., Lancel, S., Theys, N., Lukaszewski, M.A., Duban-Deweer, S., Bastide, B., Hachani, J., Cecchelli, R., Breton, C., Gabory, A., Storme, L., Reusens, B., Junien, C., Vieau, D., and Lesage, J. (2013). Maternal calorie restriction modulates placental mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency: putative involvement in fetoplacental growth defects in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 304, E14-22.
- Mayeur, S., Silhol, M., Moitrot, E., Barboux, S., Breton, C., Gabory, A., Vaiman, D., Dutriez-Casteloot, I., Fajardy, I., Vambergue, A., Tapia-Arancibia, L., Bastide, B., Storme, L., Junien, C., Vieau, D., and Lesage, J. (2010). Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human. *Placenta* 31, 785-791.
- McCulloch, L.J., van de Bunt, M., Braun, M., Frayn, K.N., Clark, A., and Gloyn, A.L. (2011). GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. *Molecular genetics and metabolism* 104, 648-653.
- McIntire, D.D., Bloom, S.L., Casey, B.M., and Leveno, K.J. (1999). Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *The New England journal of medicine* 340, 1234-1238.
- Meikle, D.B., and Drickamer, L.C. (1986). Food availability and secondary sex ratio variation in wild and laboratory house mice (*Mus musculus*). *Journal of reproduction and fertility* 78, 587-591.

Metzger, B.E., Lowe, L.P., Dyer, A.R., Trimble, E.R., Chaovarindr, U., Coustan, D.R., Hadden, D.R., McCance, D.R., Hod, M., McIntyre, H.D., Oats, J.J., Persson, B., Rogers, M.S., and Sacks, D.A. (2008). Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *The New England journal of medicine* 358, 1991-2002.

Miller, L.C., Kiernan, M.T., Mathers, M.I., and Klein-Gitelman, M. (1995). Developmental and nutritional status of internationally adopted children. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 149, 40-44.

Mohanty, S.R., Troy, T.N., Huo, D., O'Brien, B.L., Jensen, D.M., and Hart, J. (2009). Influence of ethnicity on histological differences in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* 50, 797-804.

-N-

Neel, J.V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *American journal of human genetics* 14, 353-362.

Newmann, L.S., and Campbell, P.A. (1987). Mitogenic effect of beryllium sulfate on mouse B lymphocytes but not T lymphocytes in vitro. *International archives of allergy and applied immunology* 84, 223-227.

Nichols, C.G., and Remedi, M.S. (2012). The diabetic beta-cell: hyperstimulated vs. hyperexcited. *Diabetes, obesity & metabolism* 14 Suppl 3, 129-135.

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.

Nohr, E.A., Bech, B.H., Davies, M.J., Frydenberg, M., Henriksen, T.B., and Olsen, J. (2005). Prepregnancy obesity and fetal death: a study within the Danish National Birth Cohort. *Obstetrics and gynecology* 106, 250-259.

**-O-**

Ouchi, N., and Walsh, K. (2007). Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 380, 24-30.

Owen, C.G., Whincup, P.H., Orfei, L., Chou, Q.A., Rudnicka, A.R., Wathern, A.K., Kaye, S.J., Eriksson, J.G., Osmond, C., and Cook, D.G. (2009). Is body mass index before middle age related to coronary heart disease risk in later life? Evidence from observational studies. *Int J Obes (Lond)* 33, 866-877.

**-P-**

Park, P.H., McMullen, M.R., Huang, H., Thakur, V., and Nagy, L.E. (2007). Short-term treatment of RAW264.7 macrophages with adiponectin increases tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression via ERK1/2 activation and Egr-1 expression: role of TNF-alpha in adiponectin-stimulated interleukin-10 production. *The Journal of biological chemistry* 282, 21695-21703.

Patsouris, D., Reddy, J.K., Muller, M., and Kersten, S. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the effects of high-fat diet on hepatic gene expression. *Endocrinology* 147, 1508-1516.

Petry, C.J., Ozanne, S.E., Wang, C.L., and Hales, C.N. (1997). Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in 1-year-old rats. *Clinical science* 93, 147-152.

Pijnenborg, R., and Vercruyse, L. (2006). Mathias Duval on placental development in mice and rats. *Placenta* 27, 109-118.

Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Roepke, K., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K., and Dudenhausen, J.W. (2009). Hypothalamic



proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *The Journal of physiology* 587, 4963-4976.

Plagemann, A., Heidrich, I., Gotz, F., Rohde, W., and Dorner, G. (1992). Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Experimental and clinical endocrinology* 99, 154-158.

Ponzio BF, Carvalho MH, Fortes ZB, do Carmo Franco M. (2012). Implications of maternal nutrient restriction in transgenerational programming of hypertension and endothelial dysfunction across F1-F3 offspring. *Life Sci.* 2012 Apr 20;90(15-16):571-7.

Portha, B. (2005). Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes/metabolism research and reviews* 21, 495-504.

Portha, B., Blondel, O., Serradas, P., McEvoy, R., Giroix, M.H., Kergoat, M., and Bailbe, D. (1989). The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabete & metabolisme* 15, 61-75.

Portha, B., Giroix, M.H., and Picon, L. (1982). Effect of diet on glucose tolerance and insulin response in chemically diabetic rats. *Metabolism: clinical and experimental* 31, 1194-1199.

Portha, B., Giroix, M.H., Turrel-Cuzin, C., Le-Stunff, H., and Movassat, J. (2012). The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes. *Methods in molecular biology* 933, 125-159.

Portha, B., Rosselin, G., and Picon, L. (1976). Postmaturity in the rat: impairment of insulin, glucagon, and glycogen stores. *Diabetologia* 12, 429-436.

Poston, L. (2011). Intergenerational transmission of insulin resistance and type 2 diabetes. *Progress in biophysics and molecular biology* 106, 315-322.

Poulsen, C.R., Bokvist, K., Olsen, H.L., Hoy, M., Capito, K., Gilon, P., and Gromada, J. (1999). Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 48, 2171-2181.

**-R-**

Raducanu, A., and Lickert, H. (2012). Understanding pancreas development for beta-cell repair and replacement therapies. *Current diabetes reports* 12, 481-489.

Ramachandran, A., Snehalatha, C., Dharmaraj, D., and Viswanathan, M. (1992). Prevalence of glucose intolerance in Asian Indians. Urban-rural difference and significance of upper body adiposity. *Diabetes care* 15, 1348-1355.

Reagan, P.B., and Salsberry, P.J. (2005). Race and ethnic differences in determinants of preterm birth in the USA: broadening the social context. *Social science & medicine* 60, 2217-2228.

Remacle C, Dumortier O, Bol V, Goosse K, Romanus P, Theys N, Bouckenooghe T, Reusens B. (2007) Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab.* Nov;9 Suppl 2:196-209. Review

Reece, E.A., Leguizamon, G., and Wiznitzer, A. (2009). Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet* 373, 1789-1797.

Reusens B, Remacle C. (2001). Intergenerational effect of an adverse intrauterine environment on perturbation of glucose metabolism. *Twin Res.* Oct;4(5):406-11. Review

Richardus, J.H., Graafmans, W.C., Bergsjö, P., Lloyd, D.J., Bakketeig, L.S., Bannon, E.M., Borkent-Polet, M., Davidson, L.L., Defoort, P., Leitao, A.E., Langhoff-Roos, J., Garcia, A.M., Papantoniou, N.E., Wennergren, M., Amelink-Verburg, M.P., Verloove-Vanhorick, S.P., and

Mackenbach, J.P. (2003). Suboptimal care and perinatal mortality in ten European regions: methodology and evaluation of an international audit. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 14, 267-276.

Riviere, 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.

Rosenfeld, C.S., Grimm, K.M., Livingston, K.A., Brokman, A.M., Lamberson, W.E., and Roberts, R.M. (2003). Striking variation in the sex ratio of pups born to mice according to whether maternal diet is high in fat or carbohydrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4628-4632.

### -S-

Salsberry, P.J., and Reagan, P.B. (2005). Dynamics of early childhood overweight. *Pediatrics* 116, 1329-1338.

Samuelsson, A.M., Matthews, P.A., Argenton, M., Christie, M.R., McConnell, J.M., Jansen, E.H., Piersma, A.H., Ozanne, S.E., Twinn, D.F., Remacle, C., Rowlerson, A., Poston, L., and Taylor, P.D. (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.

Shin, B.C., Fujikura, K., Suzuki, T., Tanaka, S., and Takata, K. (1997). Glucose transporter GLUT3 in the rat placental barrier: a possible machinery for the transplacental transfer of glucose. *Endocrinology* 138, 3997-4004.

Sibley CP, Coan PM, Ferguson-Smith AC, Dean W, Hughes J, Smith P, Reik W, Burton GJ, Fowden AL, Constância M. (2004). Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the

diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 25;101(21):8204-8.

Sinclair, K.D., Lea, R.G., Rees, W.D., and Young, L.E. (2007). The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 64, 425-443.

Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C.L., and Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 52, 313-320.

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. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 291, E792-799.

Staiger, H., Machicao, F., Fritsche, A., and Haring, H.U. (2009). Pathomechanisms of type 2 diabetes genes. *Endocrine reviews* 30, 557-585.

Steinthorsdottir, V., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Jonsdottir, T., Walters, G.B., Styrkarsdottir, U., Gretarsdottir, S., Emilsson, V., Ghosh, S., Baker, A., Snorraddottir, S., Bjarnason, H., Ng, M.C., Hansen, T., Bagger, Y., Wilensky, R.L., Reilly, M.P., Adeyemo, A., Chen, Y., Zhou, J., Gudnason, V., Chen, G., Huang, H., Lashley, K., Doumatey, A., So, W.Y., Ma, R.C., Andersen, G., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., van Vliet-Ostaptchouk, J.V., Hofker, M.H., Wijmenga, C., Christiansen, C., Rader, D.J., Rotimi, C., Gurney, M., Chan, J.C., Pedersen, O., Sigurdsson, G., Gulcher, J.R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., and Stefansson, K. (2007). A variant in *CDKAL1* influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nature genetics* 39, 770-775.

Stocker, C., O'Dowd, J., Morton, N.M., Wargent, E., Sennitt, M.V., Hislop, D., Glund, S., Seckl, J.R., Arch, J.R., 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. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 28, 129-136.

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 histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 45, 149-158.

Surwit, R.S., and Feinglos, M.N. (1988). Stress and autonomic nervous system in type II diabetes. A hypothesis. *Diabetes care* 11, 83-85.

Surwit, R.S., Kuhn, C.M., Cochrane, C., McCubbin, J.A., and Feinglos, M.N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 37, 1163-1167.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 50, 537-546.

Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental biology and medicine* 237, 481-490.

Szkudelski, T., and Szkudelska, K. (2002). Streptozotocin induces lipolysis in rat adipocytes in vitro. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 51, 255-259.

#### **-T-**

Takata, K., and Hirano, H. (1997). Mechanism of glucose transport across the human and rat placental barrier: a review. *Microscopy research and technique* 38, 145-152.

Tallman, D.L., and Taylor, C.G. (2003). Effects of dietary fat and zinc on adiposity, serum leptin and adipose fatty acid composition in C57BL/6J mice. *The Journal of nutritional biochemistry* 14, 17-23.

Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British journal of nutrition* 92, 347-355.

- Tsigos, C., Kyrou, I., Chala, E., Tsapogas, P., Stavridis, J.C., Raptis, S.A., and Katsilambros, N. (1999a). Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. *Metabolism: clinical and experimental* 48, 1332-1335.
- Tsigos, C., Papanicolaou, D.A., Kyrou, I., Defensor, R., Mitsiadis, C.S., and Chrousos, G.P. (1997). Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 4167-4170.
- Tsigos, C., Papanicolaou, D.A., Kyrou, I., Raptis, S.A., and Chrousos, G.P. (1999b). Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 19, 1271-1276.
- Tups, A. (2009). Physiological models of leptin resistance. *Journal of neuroendocrinology* 21, 961-971.
- Tycko, B., and Morison, I.M. (2002). Physiological functions of imprinted genes. *Journal of cellular physiology* 192, 245-258.

-U-

- Unoki, H., Takahashi, A., Kawaguchi, T., Hara, K., Horikoshi, M., Andersen, G., Ng, D.P., Holmkvist, J., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Sandbaek, A., Lauritzen, T., Hansen, T., Nurbaya, S., Tsunoda, T., Kubo, M., Babazono, T., Hirose, H., Hayashi, M., Iwamoto, Y., Kashiwagi, A., Kaku, K., Kawamori, R., Tai, E.S., Pedersen, O., Kamatani, N., Kadowaki, T., Kikkawa, R., Nakamura, Y., and Maeda, S. (2008). SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nature genetics* 40, 1098-1102.

**-V-**

Vercruyse, L., Caluwaerts, S., Luyten, C., and Pijnenborg, R. (2006). Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta* 27, 22-33.

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. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 279, E83-87.

**-W-**

Waddington, C.H. (1974). A catastrophe theory of evolution. *Annals of the New York Academy of Sciences* 231, 32-42.

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.

Wallace, J.M., Horgan, G.W., and Bhattacharya, S. (2012). Placental weight and efficiency in relation to maternal body mass index and the risk of pregnancy complications in women delivering singleton babies. *Placenta* 33, 611-618.

Waterland, R.A., and Garza, C. (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American journal of clinical nutrition* 69, 179-197.

Weigert, J., Obermeier, F., Neumeier, M., Wanninger, J., Filarsky, M., Bauer, S., Aslanidis, C., Rogler, G., Ott, C., Schaffler, A., Scholmerich, J., and Buechler, C. (2010). Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 16, 630-637.

Weiss, J.L., Malone, F.D., Emig, D., Ball, R.H., Nyberg, D.A., Comstock, C.H., Saade, G., Eddleman, K., Carter, S.M., Craigo, S.D., Carr, S.R., and D'Alton, M.E. (2004a). Obesity,

obstetric complications and cesarean delivery rate--a population-based screening study. *American journal of obstetrics and gynecology* 190, 1091-1097.

Weiss, R., Dziura, J., Burgert, T.S., Tamborlane, W.V., Taksali, S.E., Yeckel, C.W., Allen, K., Lopes, M., Savoye, M., Morrison, J., Sherwin, R.S., and Caprio, S. (2004b). Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *The New England journal of medicine* 350, 2362-2374.

White, B.D., and Martin, R.J. (1997). Evidence for a central mechanism of obesity in the Zucker rat: role of neuropeptide Y and leptin. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 222-232.

Williams, M.A., Qiu, C., Dempsey, J.C., and Luthy, D.A. (2003). Familial aggregation of type 2 diabetes and chronic hypertension in women with gestational diabetes mellitus. *The Journal of reproductive medicine* 48, 955-962.

Wilson, M.R., and Hughes, S.J. (1997). The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *The Journal of endocrinology* 154, 177-185.

Winick, M. (1985). Environmental factors affecting fetal growth. *Current concepts in nutrition* 14, 93-102.

Wu, Q., and Suzuki, M. (2006). Parental obesity and overweight affect the body-fat accumulation in the offspring: the possible effect of a high-fat diet through epigenetic inheritance. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 7, 201-208.

**-Y-**

Yamauchi, T., and Kadowaki, T. (2008). Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7, S13-18.



**-Z-**

Zung, A., Elizur, M., Weintrob, N., Bistrizter, T., Hanukoglu, A., Zadik, Z., Phillip, M., Miller, K., Koren, I., Brautbar, C., and Israel, S. (2004). Type 1 diabetes in Jewish Ethiopian immigrants in Israel: HLA class II immunogenetics and contribution of new environment. *Human immunology* 65, 1463-1468.