



UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE (LILLE 1)  
ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE ET SANTE » DE LILLE

## THESE

---

EFFETS D'UNE DENUTRITION MATERNELLE PERINATALE  
SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES CHROMAFFINES  
DE LA MEDULLOSURRENALE :  
DES ALTERATIONS PRECOCES AUX IMPLICATIONS POSSIBLES DANS LA  
PROGRAMMATION DE PATHOLOGIES A L'AGE ADULTE

---

PAR

Olivier MOLENDI-COSTE

Soutenue le 14 décembre 2007

Devant un jury composé de :

Patricia Parnet	INRA Nantes	Rapporteur
Laurent Yon	Université de Rouen	Rapporteur
Brigitte Reusens	Université Catholique de Louvain	Examinateur
Christophe Breton	Université des Sciences et Technologies de Lille	Directeur
Christine Laborie	Université des Sciences et Technologies de Lille	Co-directeur

SCD LILLE 1



D 030 258655 7

*Par où commencer, après quatre années de vie, de bondissements et rebondissements, ainsi que de joies et de peines au sein du laboratoire, qui fût, sera sûrement encore, et restera en tout cas imprimé dans mes circuits nerveux comme celui de Neuroendocrinologie du Développement ? Peut-être par remercier toutes les personnes qui ont accompagné le petit étudiant que j'étais, et que je suis en quelques sortes resté, le long des jours (et des nuits !) consacrés à cette thèse. A tous donc, sincèrement et vigoureusement merci !*

*A toi Christine, je ne puis qu'exprimer, au final, mes regrets de n'avoir su retenir, et te faire retenir, que de façon trop ténue l'élan des heures interminables passées devant le microscope, des discussions sans fin sur la portée de nos résultats, des arrachages de cheveux à se déchiffrer mutuellement, in french comme in english, de nos échanges scientifiques, de nos sacrifices et dissections en masse dignes du meilleur « Brain Dead »... en bref, de tout ce dont notre relation s'est nourrie. Au-delà de cela, ce travail, si j'en suis l'auteur principal, tu en es le moteur ainsi que le pilier, et les mots me manquent pour exprimer tout ce que je te dois. Le plus sincère et le moins assuré de mes remerciements sera donc pour toi, pour ton énergie, ta disponibilité, et ta patience, à juste titre non sans limites.*

*Comment te dire, Christophe, en quelques mots la reconnaissance et l'affection que j'ai envers toi ? De l'apprentissage micrométrique de la PCR à nos discussions les plus sincères, de ta tempérance à ton extravagance, de la finesse de ton encadrement à tes remarques les plus insolites, de tes coups de fouet à tes pansements les mieux placés, ces quelques années passées à tes côtés resteront pour moi une source de joie, d'inspiration, et de réflexion, ainsi qu'un modèle, si ce n'est de dénutrition (il faut manger le midi m'a-t-on appris par le passé), de remise en question et de vigilance.*

*A toi Didier, qui m'a accueilli sans réserves et dans des conditions somme toutes atypiques ; qui a su très tôt éveiller ma fibre scientifique, y veiller tout au long de ces années, et même la réveiller dans les heures obscures qui ont profondément ébranlé cette aventure ; qui vit par la science et pour la science, à toi va ma gratitude la plus profonde et repentie, et mon respect le plus rigoureux.*

*Je tiens également à exprimer mes remerciements et ma sincère sympathie à tous les membres du laboratoire. Bien que la vie continue (et heureusement), avec ses carrefours et ses aléas, votre présence au cours de ces années ne les en laisseront que plus riches et agréables. Merci à vous Valérie, Anne, Françoise, Jean, et Isabelle pour votre présence et vos conseils, votre aide primordiale et gratuite, ainsi que pour votre soutien, votre joie de vivre, et votre bonne humeur. Merci du fond du cœur.*



*Un petit clin d'œil technique à Val pour son rôle central dans le fonctionnement de l'HPLC, à Gilles pour ses polissages répétés des électrodes, à Joël Mazurier et Anne-Sophie Blervacq pour l'utilisation des microscopes à épi-fluorescence, à Yann Guerardel pour l'utilisation exceptionnelle de la chaîne d'HPLC, à Annie pour sa sympathie et son accompagnement dans les marquages immunohistochimiques, à Gilles Courtand et Loïc Brunet pour leur assistance infographique, ainsi qu'à Lolo pour son incarnation de « Word, et autres, pour les nuls ». De plus, je tiens à exprimer ma gratitude à nos différents collaborateurs, dont l'équipe de l'unité INSERM 413 de Rouen pour les manips de macroarray, de RT-PCR en temps réel, et d'activité caspase-3, Corinne Abbadie pour son aide et son support dans les expériences de TUNEL et de marquages caspase-3, et, de façon inversement proportionnelle à la taille des phénomènes observés ensemble, à Franck Vandebulcke pour les manipulations en microscopie électronique.*

*Toute mon amitié va, sans équivoque, à mes congénères et frères doctorants du bâtiment, sans qui bien des journées seraient restées ordinaires et banales. A vous tous, je veux juste dire toute l'affection que je ressens, et le lien profond qui en découle. Guillaume, Vincent, et Jérôme, fussions-nous nouvellement disséminés aux pays du camembert, des spaghettis, ou des terrils, nous ne serons jamais vraiment loin les uns des autres...*

*Bien qu'à titre posthume pour la plupart, merci à Tchaïkovski, Brahms, Beethoven, Gershwin, Borodine, Yehudi Menuhin, Hilary Hahn et autres pour leur soutien musical...*

*A mes parents, mon frère, ainsi qu'à mes amis, cette thèse n'aurait pas eu de sens ni de fin si vous n'aviez été présents au cours de ces années, et bien avant. Pour cette force, je vous suis éternellement redevable, et je vous témoigne ici toute mon affection, ma reconnaissance, et ma gratitude. Cette thèse est donc en partie la vôtre.*

*Elle est également à toi, Hélène, qui, tout en illuminant nos jours par ta douceur et ta sagesse, a su en supporter les armées « Agammemnonnesques » d'impératifs et de non disponibilité, ainsi que le perfide cheval du doute. Du plus profond de mon cœur, merci mon Amour.*

*Enfin, cette thèse est entièrement dédiée, des matinées d'absence aux nuits de fatigue, des joies aux déceptions qui en ont découlées, et de l'investissement originel à ce que l'avenir nous réserve, au plus merveilleux des fruits que la Terre ait porté... Pomme (bien qu'elle n'ait pu y participer, question d'éthique...).*

Le travail effectué au cours de cette formation doctorale a donné lieu à trois publications acceptées dans des revues internationales à comité de lecture, un article soumis, et un article en cours de rédaction.

Molendi-Coste O., Grumolato L., Laborie C., Lesage J., Maubert E., Ghzili H., Vaudry H., Anouar Y., Breton C., and Vieau D. (2006). Maternal perinatal undernutrition alters neuronal and neuroendocrine differentiation in the rat adrenal medulla at weaning. *Endocrinology* 147, 3050-3059.

Vieau D., Sebaai N., Leonhardt M., Dutriez-Casteloot I., Molendi-Coste O., Laborie C., Breton C., Deloof S., and Lesage J. (2007). HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology* Aug;32 Suppl 1:S16-20. *Epub 2007 Jul 17*

Molendi-Coste O., Mairesse J., Aubert N., Ghzili H., Abbadie C., Vaudry H., Gonzalez B., Anouar Y., Vieau D., Breton C., and Laborie C. (2007). Maternal perinatal undernutrition impairs chromaffin cells proliferation in the postnatal rat. *Horm Metab Res.*, accepté.

Molendi-Coste O., Laborie C., Scarpa M.C., Montel V., Vieau D., and Breton C. (2007). Maternal perinatal undernutrition alters postnatal development of chromaffin cells in the rat adrenal medulla. *J Neuroendocrinol.*, soumis.

Molendi-Coste O., Laborie C., Vandembulcke F., Grumolato L., Ghzili H., Anouar Y., Vaudry H., Breton C., and Vieau D. Maternal perinatal undernutrition alters sympathomedullary homeostasis in the adult rat. En cours de rédaction.

Selon la théorie de la programmation précoce des maladies chroniques de l'adulte, ou théorie de Barker, il existe des périodes critiques de l'ontogenèse durant lesquelles un environnement défavorable, tel qu'une sous-nutrition, entraînerait des adaptations du développement et de la fonctionnalité de certains organes et axes neuroendocriniens, ce qui, une fois l'environnement redevenu plus favorable, conduirait à l'augmentation de la prévalence de pathologies apparentées au syndrome métabolique au cours du vieillissement. Le système sympathosurrénalien et les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale, intervenant dans la réponse au stress et la régulation du métabolisme via la libération des catécholamines, constituent vraisemblablement une cible potentielle de la programmation. Cependant, l'impact des conditions nutritionnelles précoces sur le développement des cellules chromaffines ainsi que les conséquences possibles sur leur activité à l'âge adulte ne sont pas connus. Nous avons alors entrepris d'analyser les effets d'une dénutrition maternelle périnatale de 50 %, pratiquée de la dernière semaine de gestation au sevrage, chez le rat mâle au cours de l'ontogenèse et à l'âge adulte.

Nous avons ainsi pu démontrer l'existence de profondes altérations de la différenciation des cellules chromaffines et de la mise en place de leur innervation au cours de l'ontogenèse suite à la dénutrition. Ces altérations consistent principalement en une réduction précoce de l'agrégation des cellules chromaffines noradrénergiques, accompagnée de modifications de la réponse de la médullosurrénale à un stress métabolique, et d'une intensification de l'innervation sympathique de la médulla. Au sevrage, ces modifications aboutissent à une augmentation de 40 % des taux plasmatiques de catécholamines en conditions de repos, ce qui traduit une hyperactivité des cellules chromaffines. Parallèlement, la dénutrition périnatale altère également l'ultrastructure et la prolifération des cellules chromaffines, ce qui est à relier avec la surexpression d'un certain nombre de gènes impliqués notamment dans la différenciation neuroendocrine, le trafic des vésicules, la prolifération et l'apoptose.

Des travaux récents montrent également que ces modifications précoces entraînent des répercussions à long terme sur la morphologie, l'innervation, l'expression génique, et l'activité de la glande médullosurrénale, notamment en réponse au stress. En considérant l'influence majeure des catécholamines sécrétées par la médullosurrénale dans le maintien de l'homéostasie, nos observations montrent que les adaptations du système sympathosurrénalien constituent un des mécanismes potentiellement impliqués dans la programmation nutritionnelle de pathologies apparentées au syndrome métabolique.

## Sommaire

Liste des abréviations.....	4
Avant-propos.....	6
<b>I INTRODUCTION : LE SYSTEME SYMPATHOSURRENALIEN, UNE CIBLE POSSIBLE DE LA PROGRAMMATION PRECOCE .....</b>	<b>7</b>
I.A. Concept de programmation précoce des maladies chroniques : l'hypothèse de Barker.....	8
I.A.1. Données épidémiologiques et concept de programmation .....	9
I.A.1.1. « Syndrome métabolique » et santé publique.....	9
I.A.1.2. Retard de croissance intra-utérin et développement de pathologies chroniques à l'âge adulte.....	13
I.A.2. Modèles animaux de programmation .....	20
I.A.2.1. Les différents modèles de retard de croissance .....	20
Notion de fenêtre de programmation : ontogenèse et environnement.....	23
I.A.2.2. Le modèle FR50.....	25
Restriction alimentaire et protocole expérimental.....	25
Retard de croissance précoce .....	26
Altérations de l'équilibre neuroendocrinien et métabolique .....	27
I.A.3. Bases physiopathologiques de la programmation.....	31
I.A.3.1. Programmation neuroendocrinienne .....	31
L'axe somatotrope.....	31
L'axe adipo-insulaire .....	32
I.A.3.2. Adaptation au stress : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et glucocorticoïdes .....	34
L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	34
Glucocorticoïdes et programmation .....	36
Exemple des animaux FR50.....	38
I.A.3.3. Programmation précoce et modifications épigénétiques .....	41
I.B. Adaptation au stress et programmation de l'activité de la glande surrénale : quid du système sympathosurrénalien ?.....	44
I.B.1. La glande surrénale.....	45
I.B.2. Pathologies surrénaliennes et syndrome métabolique .....	48
I.B.2.1. Syndrome de Cushing et glucocorticoïdes .....	48
I.B.2.2. Phéochromocytomes et catécholamines.....	49
I.B.3. Système sympathosurrénalien et programmation fœtale .....	50
I.B.3.1. Données épidémiologiques .....	50
I.B.3.2. Données expérimentales.....	52
Le système nerveux sympathique .....	52
La glande médullosurrénale .....	56
I.C. Le système sympathosurrénalien .....	59
I.C.1. Description du système nerveux sympathique.....	61
I.C.1.1. Le système sympathique .....	61
I.C.1.2. Contrôle central.....	65
I.C.2. Embryogénèse des cellules de la lignée sympathosurrénalienne.....	67

I.C.2.1. Les cellules de la crête neurale.....	67
I.C.2.2. Migration.....	68
I.C.2.3. Induction et différenciation des précurseurs sympathosurréaliens.....	72
I.C.3. Ontogenèse de la glande médullosurrénale.....	76
I.C.3.1. Colonisation du cortex surrénalien et différenciation des cellules chromaffines.....	76
Colonisation du cortex surrénalien.....	76
Facteurs du microenvironnement.....	78
Différenciation adrénergique : glucocorticoïdes et PNMT.....	81
Synthèse des catécholamines.....	82
Intérêts des marqueurs moléculaires.....	83
I.C.3.2. Agrégation et prolifération des cellules chromaffines.....	84
Morphologie et molécules d'adhésion.....	84
Prolifération et croissance des cellules chromaffines.....	85
I.C.3.3. Influences de l'innervation.....	87
Innervation préganglionnaire.....	87
Développement et maintien des neurones préganglionnaires.....	88
Existence de neurones sympathiques intramédullaires.....	89
I.C.4. Fonctions du système sympathosurrénalien.....	90
I.C.4.1. Régulation du métabolisme énergétique et de la glycémie.....	91
Effets sur la sécrétion d'insuline.....	91
Glycogénolyse et néoglucogenèse hépatique.....	92
Métabolisme musculaire.....	92
Lipolyse.....	93
I.C.4.2. Régulation du métabolisme cardiovasculaire.....	93
Activité cardiaque.....	93
Vascularisation et redistribution de l'afflux sanguin.....	94
Rein et contrôle de la volémie.....	94
I.C.4.3. Autres.....	96
I.D. Objectifs de la thèse.....	97
II EFFETS D'UNE DENUTRITION MATERNELLE PERINATALE SUR LE DEVELOPPEMENT DE LA MEDULLOSURRENALE CHEZ LE RAT MALE.....	99
II.A. Influence de la dénutrition maternelle sur la mise en place et la différenciation des cellules de la médullosurrénale chez le rat mâle au sevrage.....	100
II.A.1. Résultats.....	101
II.A.1.1. Article 1.....	101
II.A.1.2. Article 2.....	112
II.A.2. Résultats complémentaires et discussion.....	129
II.A.2.1. Modifications de l'innervation préganglionnaire cholinergique.....	129
II.A.2.2. Modifications de l'ultrastructure des granules de sécrétion des cellules chromaffines.....	130
II.A.2.3. Altérations de la balance prolifération/apoptose.....	136
II.A.2.4. Altérations géniques.....	139
II.A.2.5. Conclusion.....	141
II.B. Influences de la dénutrition maternelle sur l'ontogenèse de la médullosurrénale au cours de la période postnatale.....	144
II.B.1. Résultats : Article 3.....	144

II.B.2. Résultats complémentaires et discussion.....	179
II.B.2.1. Activité caspase-3 .....	179
II.B.2.2. Discussion complémentaire .....	180
II.B.2.3. Conclusion .....	182
<b>III EFFETS DE LA DENUTRITION MATERNELLE PERINATALE SUR LA MORPHOLOGIE, L'ACTIVITE ET L'EXPRESSION GENIQUE DE LA GLANDE MEDULLOSURRENALE CHEZ LE RAT MALE ADULTE....</b>	<b>184</b>
III.A. Introduction.....	185
III.B. Matériels et Méthodes.....	187
III.B.1. Groupes expérimentaux et prélèvements .....	187
III.B.2. Immunohistochimie .....	187
III.B.3. Microscopie électronique.....	188
III.B.4. Macroarrays .....	189
III.B.5. Activité acétylcholine estérase.....	190
III.B.6. Chromatographie Liquide à haute performance.....	190
III.B.7. Mesure de la pression artérielle par pléthysmographie.....	191
III.B.8. Statistiques et outils informatiques .....	191
III.C. Résultats.....	193
III.C.1. Analyse biométrique .....	193
III.C.2. Morphologie de la médullosurrénale .....	194
III.C.3. Activité de la glande médullosurrénale.....	196
III.C.4. Microscopie électronique.....	197
III.C.5. Activité acétylcholine estérase.....	199
III.C.6. Expression génique .....	200
III.C.7. Métabolisme .....	203
III.D. Discussion.....	204
III.D.1. Structure.....	204
III.D.2. Innervation .....	205
III.D.3. Activité .....	206
<b>IV DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES : IMPLICATIONS POTENTIELLES DU SYSTEME SYMPATHOSURRENALIEN DANS LA PROGRAMMATION DE PATHOLOGIES .....</b>	<b>210</b>
IV.A. Hypertension artérielle.....	211
IV.B. Altérations du métabolisme énergétique .....	215
IV.B.1. Métabolisme glucidique.....	216
IV.B.2. Métabolisme lipidique .....	217
IV.C. Effets de la dénutrition périnatale au niveau central .....	221
Conclusion .....	225
Bibliographie.....	228

## Liste des abréviations

A :	adrénaline (adrénergique par extension)
AChE :	acétylcholine estérase
ACTH :	Adrenocorticotropie Hormone ; hormone adrénocorticotrope
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
AVP :	arginine-vasopressine
CC :	cellules chromaffines
CCN :	cellules de la crête neurale
GH :	Growth Hormone ; hormone de croissance
GR :	récepteur aux glucocorticoïdes
HHS :	hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography ; chromatographie haute performance en phase liquide
IGF :	Insulin-like Growth Factor ; facteur de croissance apparentés à l'insuline
IGF-BP :	IGF-Binding Protein ; protéine de transport de l'IGF
KO :	Knock-Out ; invalidation génique
MR :	récepteur aux minéralocorticoïdes
NA :	noradrénaline (noradrénergique par extension)
NPV :	noyau para-ventriculaire
POMC :	proopiomélanocortine
PCR :	Polymerase Chain Reaction ; réaction de polymérisation en chaîne
RCIU :	retard de croissance intra-utérin

RT :	Reverse Transcription ; transcription inverse
PACAP :	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PNMT :	phényléthanolamine-N-méthyl-transférase
SCG :	Small Containing Granules (cells) ; petites (cellules) contenant des granules
SIF :	Small Intensely Fluorescent (cells) ; petites (cellules) intensément fluorescentes
SSR :	sympathosurrénalien
SNS :	système nerveux sympathique
SNC :	système nerveux central
TGF $\beta$ :	Transforming Growth Factor $\beta$ ; facteur de croissance $\beta$ de transformation
TH :	tyrosine-hydroxylase

## AVANT-PROPOS

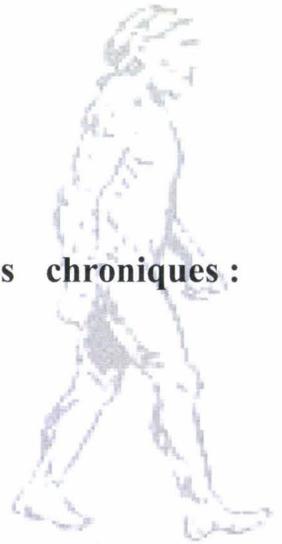
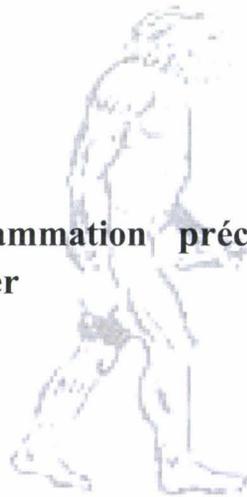
Le syndrome métabolique, ou association de pathologies métaboliques et cardiovasculaires, représente actuellement une des premières causes de mortalité dans les pays riches, et, face à l'épidémie observée sur les différents continents, constitue vraisemblablement un défi majeur de santé et d'économie mondiales pour le 21<sup>ème</sup> siècle. Cette recrudescence pourrait être liée à la détérioration des conditions de vie précoce, comme le défend la théorie de la programmation précoce des maladies chroniques de l'adulte. En effet, il existe des périodes critiques de l'ontogenèse durant lesquelles un environnement défavorable, tel qu'une sous-nutrition, entraînerait des adaptations anatomiques, fonctionnelles et génétiques du développement précoce de certains organes et axes neuroendocriniens, qui, persistant à l'âge adulte, conduiraient à l'augmentation de la prévalence des pathologies apparentées au syndrome métabolique. Parmi les structures les plus sensibles aux conditions environnementales précoces se trouvent celles appartenant à l'axe du stress (ou axe corticotrope) et aux systèmes impliqués dans le contrôle du métabolisme, tels que les axes somatotrope et adipo-insulaire.

Le système sympathosurrénalien, constitué du système nerveux sympathique et des cellules chromaffines de la glande médullosurrénale, intervient, via la libération des catécholamines, à de multiples niveaux dans la régulation de l'homéostasie énergétique et cardiovasculaire, et particulièrement en réponse au stress. Puisqu'un dysfonctionnement de ce système exerce des effets adverses sur les fonctions qu'il contrôle, il constitue une cible potentielle de la programmation et un lien probable entre altérations précoces et pathologies tardives. Cependant, les effets d'une dénutrition précoce sur son développement et son activité à l'âge adulte ne sont pas connus.

Afin d'apporter des preuves que le système sympathosurrénalien puisse être sensible aux conditions nutritionnelles au cours de son développement, les travaux effectués au cours de cette thèse ont eu pour but : premièrement, d'analyser les processus de différenciation et de maturation des cellules chromaffines, qui se mettent en place au cours du développement postnatal, dans un modèle de dénutrition maternelle périnatale de 50 % pratiquée chez le rat ; et deuxièmement, d'en évaluer les effets à long terme sur la fonctionnalité et la physiologie de la glande médullosurrénale.

**I INTRODUCTION : LE SYSTEME SYMPATHOSURRENALIEN, UNE CIBLE POSSIBLE DE LA PROGRAMMATION PRECOCE**





**I.A. Concept de programmation précoce des maladies chroniques : l'hypothèse de Barker**



I.A.1. Données épidémiologiques et concept de programmation

I.A.1.1. « Syndrome métabolique » et santé publique

Le syndrome métabolique (Bjorntorp, 1992), défini par le NCEP<sup>1</sup> et l’OMS<sup>2</sup> comme l’association symptomatologique de troubles homéostatiques, parmi lesquels se trouvent l’obésité, le diabète de type II (regroupant intolérance au glucose et résistance à l’insuline), l’hypertension artérielle ainsi que l’hypercholestérolémie et l’hypertriglycéridémie, constitue aujourd’hui un des problèmes majeurs de santé mondiale.

L’obésité est, de par sa forte représentation dans le monde (figure 1), la première maladie non infectieuse à avoir été reconnue comme telle par l’OMS. Aux Etats-Unis, par exemple, la situation est de plus en plus inquiétante, avec une recrudescence alarmante<sup>2</sup> (figure 1B). En effet l’enquête NHANES III (88-94) faisait état de 19,7% et 24,7% d’obèses respectivement chez les hommes et les femmes âgés de 20-74 ans (Flegal *et al.*, 1998). A l’heure actuelle, environ 60% de la population américaine adulte présente une surcharge pondérale ou une obésité, qui sont tenues pour responsables de 300 000 décès par an. De plus, 30% des adolescents en surpoids présentent un syndrome métabolique, ce qui représente environ 910 000 individus. En Europe, les différents centres de l’étude MONICA (de 83 à 86) ont décrit une prévalence moyenne de l’obésité de 15% et 20% respectivement chez les hommes et femmes âgés de 25-64 ans (Seidell, 1997). Des études réalisées au Japon à l’aide des données collectées par le plan « National Health and Nutrition Survey » (Nishimura *et al.*, 2007), ainsi qu’en Inde (Yajnik, 2004) font état d’une situation comparable sur le continent asiatique. En France, l’étude ObEpi/SOFRES 1997 a évalué la prévalence du surpoids et de l’obésité à 28,5 et 8,2% de la population globale respectivement. Parallèlement, l’étude SU.VI.MAX (Hercberg, 1997; Hercberg *et al.*, 1998a; Hercberg *et al.*, 1998b), qui fut capitale dans l’évaluation des habitudes alimentaires de la population française, précise que la prévalence de l’obésité chez les individus âgés de 45 à 60 ans est de 8,5% chez les hommes et 7,5% chez les femmes (figure 1C), tandis que celle de la surcharge pondérale est de 45% chez les hommes contre 21% chez les femmes, identifiant cette tranche d’âge comme la population la plus touchée pour les 2 sexes.

---

<sup>1</sup> National cholesterol education programm

<sup>2</sup> Organisation mondiale de la santé

## Prévalence de l'obésité dans le monde

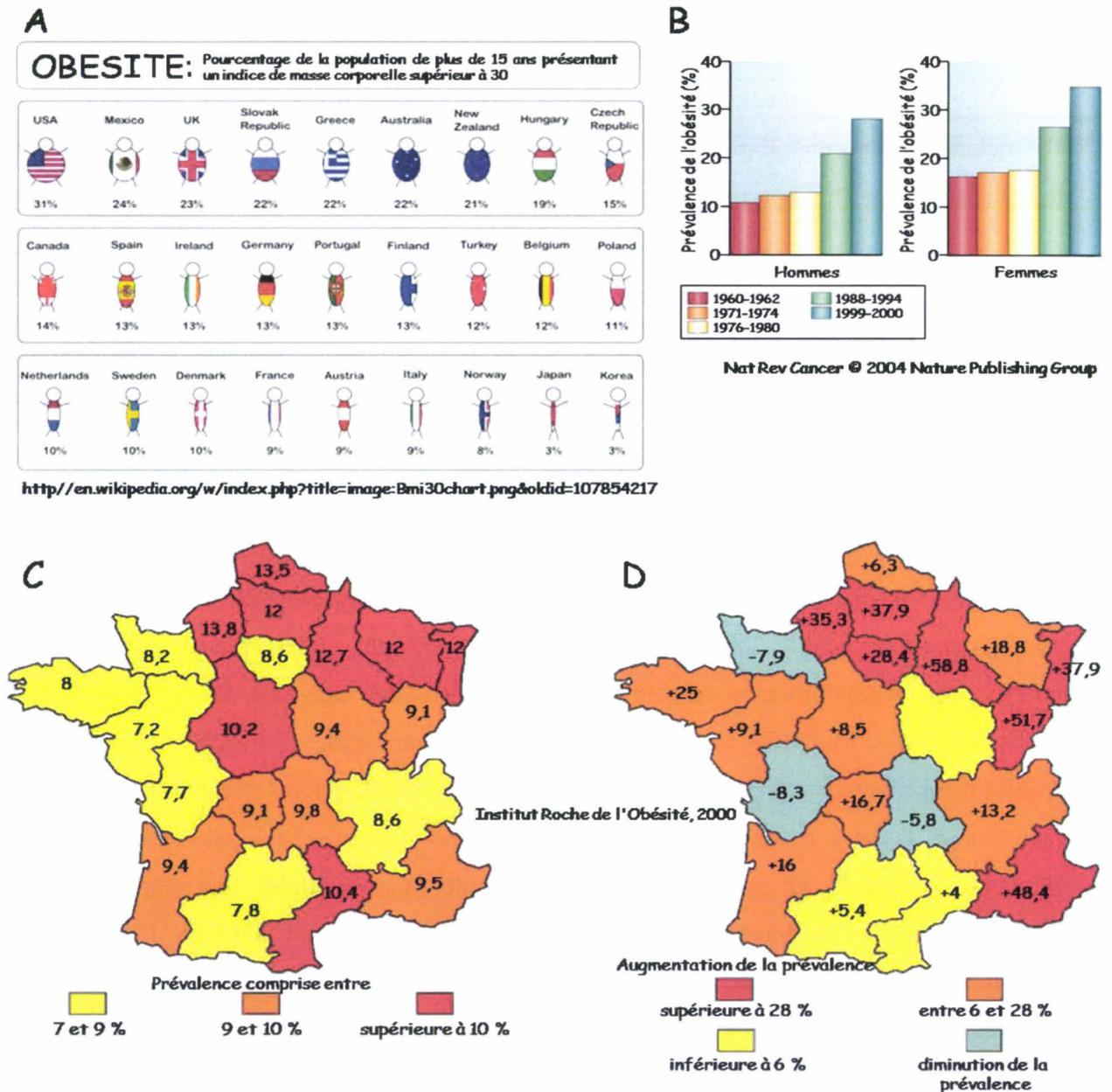
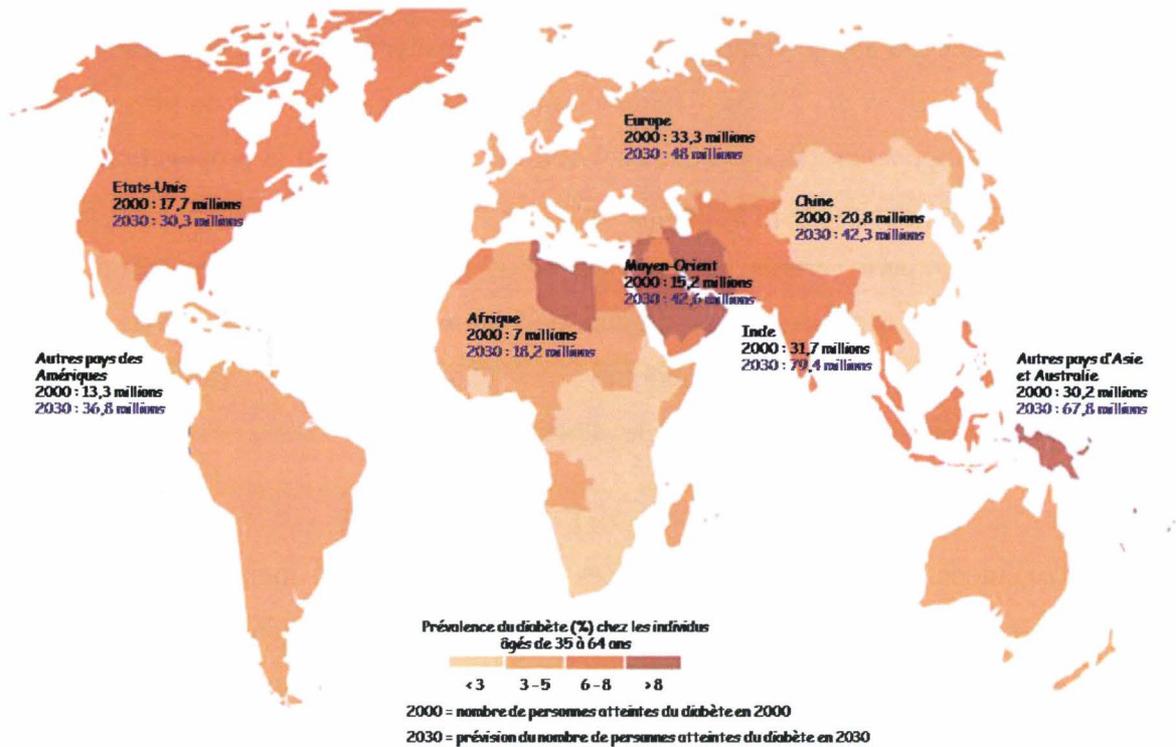


Figure 1 : Prévalence de l'obésité dans le monde. A : classement des pays en fonction du pourcentage de la population âgée de plus de 15 ans présentant une obésité (indice de masse corporelle supérieur à 30). B : évolution de la prévalence de l'obésité aux Etats-Unis entre 1960 et 2000 chez les individus des deux sexes. C : prévalence de l'obésité chez les adultes français par région en 2000. D : évolution de la prévalence de l'obésité chez les adultes français par région entre 1977 et 2000.

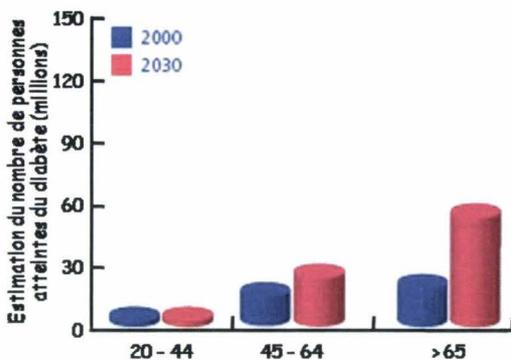
A

## Prévalence du diabète dans le monde



B

### Pays développés



C

### Pays en voie de développement

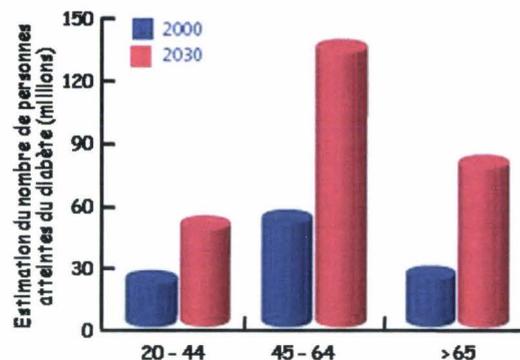


Figure 2 : Prévalence du diabète dans le monde. A: pourcentage de la population atteinte par le diabète dans divers pays et continents en 2000, et projection statistique de l'évolution de ce pourcentage en 2030. B et C: estimation du nombre de personnes atteintes dans les pays développés et en voie de développement en fonction des tranches d'âge.

L'exemple du diabète est tout aussi alarmant (figure 2). Selon l'OMS, le nombre de diabétiques dans le monde, qui était de 171 millions en 2001 (soit 2,8% de la population mondiale), pourrait atteindre les 366 millions en 2030 (soit 4,4% de la population mondiale), soulignant par là l'importance de la prise en charge et de la prévention de cette pathologie (Wild *et*

al., 2004). Par ailleurs, les auteurs pointent du doigt l'augmentation parallèle de la prévalence de l'obésité, qui ne peut qu'aggraver le pronostic proposé. Bien que les décès attribués au diabète ne représentaient que 2 à 3% de la mortalité dans les pays pauvres en 2000, contre 8% aux Etats-Unis et au Canada (Roglic *et al.*, 2005), l'épidémie mondiale touche aussi, et de plus en plus, ces pays en voie de développement (figure 2C). Ceci pourrait être à relier à la propagation du style de vie dit « occidental » à certaines populations exposées depuis des générations à des conditions plus drastiques. Des experts, réunis en Australie le 13 novembre 2006, ont même envisagé que l'épidémie de « diabésité<sup>3</sup> » menace d'extinction les peuples indigènes d'Asie, d'Australie, du Pacifique et des Amériques (Cité par Henriette Sarraseca, [http://www.rfi.fr/actufr/articles/083/article\\_47464.asp](http://www.rfi.fr/actufr/articles/083/article_47464.asp)).

Les études gouvernementales réalisées dans différents pays montrent qu'un adulte sur 4 ou sur 5 présente une association des symptômes du syndrome métabolique, avec une prévalence plus élevée dans les tranches de population plus âgées. Ces résultats soulignent l'augmentation préoccupante de la part de population atteinte par une ou plusieurs de ces pathologies dans un grand nombre de nations, telle l'Espagne (Garces and de Oya, 2007). En effet, en considérant les planifications actuelles, le syndrome métabolique constituera d'ici peu le problème majeur de santé mondiale, avec des répercussions économiques inquiétantes. L'OMS va jusqu'à parler d'épidémie<sup>4</sup> concernant l'obésité, mais au vu de la globalisation des pathologies métaboliques et cardiovasculaires, le terme pandémie<sup>5</sup> pourra bientôt être employé, si ce n'est déjà le cas. Comme le notent l'OMS et la FID<sup>6</sup>, les principaux facteurs de risques du diabète de type II, et plus globalement du syndrome métabolique, sont liés au comportement de type occidental, tels qu'une alimentation hypercalorique - riche en sucres, lipides saturés et sel – et déséquilibrée en

---

<sup>3</sup> Contraction des termes diabète et obésité

<sup>4</sup> Une **épidémie** est le développement ou la propagation rapide d'une maladie infectieuse aux effets significatifs, le plus souvent par contagion, touchant simultanément un grand nombre de personnes. Le terme est utilisé également, par exemple par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour d'autres phénomènes que des maladies infectieuses.

<sup>5</sup> Une **pandémie** est une épidémie qui s'étend à la quasi-totalité d'une population d'un ou de plusieurs continents, voire dans certains cas de la planète, soit à l'occasion de l'apparition (ou réapparition) d'un « nouveau » microbe ou virus contagieux, pathogène et non reconnu par le système immunitaire humain, soit à l'occasion de l'émergence d'un sous-type résultant d'une modification génétique majeure.

<sup>6</sup> Fédération internationale du diabète

micronutriments, un mode de vie sédentaire, ou encore une consommation excessive d'alcool et de tabac (<http://www.who.int/diabetes/en/>). Cependant, l'inégalité des individus face à ces facteurs suggère l'existence de mécanismes, innés ou acquis, menant à une sensibilité accrue aux effets délétères du style de vie occidental, et à une prédisposition au développement des pathologies qui en découlent. Des études épidémiologiques menées dans différents pays et prenant en compte différents facteurs potentiels<sup>7</sup> ont pu mettre en évidence l'influence prépondérante de l'environnement fœtal et postnatal précoce, et plus particulièrement des conditions nutritionnelles, sur la propension à développer un syndrome métabolique au cours de la vie.

*I.A.1.2. Retard de croissance intra-utérin et développement de pathologies chroniques à l'âge adulte*

Bien qu'un retard de croissance intra-utérin<sup>8</sup> (RCIU) puisse découler de composantes génétiques aussi bien que d'un environnement prénatal défavorable, dès 1952, Pombo arriva à la conclusion que la majeure partie (62%) des variations dans le poids de naissance sont attribuables à l'environnement intra-utérin, tandis que les caractéristiques génétiques maternelles et paternelles incombent pour seulement 20% et 18% respectivement (Robert and Bear, 1997). Les études pionnières des docteurs Gennser et Wadsworth réalisées au milieu des années 80 sur des individus adultes nés dans les hôpitaux britanniques sont les premières à avoir fait état d'un lien entre un faible poids à la naissance, caractéristique d'un RCIU, et le développement d'une hypertension diastolique et systolique à l'âge de 28 et 36 ans respectivement (Wadsworth *et al.*, 1985). En 1988, Barker et Osmond décrivent la même corrélation inverse entre pression artérielle et poids de naissance chez des enfants âgés de 10 ans, et émirent l'hypothèse que l'hypertension était le lien entre un environnement intra-utérin délétère et les risques de développer des maladies cardiovasculaires chez l'adulte (Barker and Osmond, 1988). Ces travaux fondamentaux établissent les bases de la théorie de la programmation précoce des maladies chroniques de l'adulte, selon laquelle il existe des périodes critiques de l'ontogenèse durant lesquelles un environnement défavorable, tel qu'une sous-nutrition, entraînerait des modifications anatomiques, fonctionnelles

---

<sup>7</sup> Conditions de développement (nutrition et addictions maternelles et de l'individu), polymorphisme génique, origine ethnologique

<sup>8</sup> Un retard de croissance intra-utérin est défini cliniquement par un poids, une taille ou un périmètre crânien ou abdominal de naissance inférieur au dixième percentile, c'est à dire appartenant aux 10% des fœtus les plus petits à âge gestationnel égal. Le poids de naissance moyen chez l'être humain est d'environ 3350 g, un faible poids de naissance étant admis à partir de 2000 à 2500 g environ suivant les populations considérées et la physionomie des parents.

et métaboliques du fœtus qui conduiraient à l'augmentation de la prévalence de pathologies à long terme. Ces modifications, visant à préparer le fœtus aux futures conditions extra-utérines délétères, mèneraient à une « mésadaptation » de l'organisme une fois celui-ci confronté à un environnement plus favorable (Barker, 1998). En 20 ans, des dizaines d'études épidémiologiques établies sur les différents continents ont largement confirmé l'influence d'un retard de croissance intra-utérin et postnatal précoce sur la prévalence d'un large spectre de pathologies ou symptomatologies regroupées communément sous le terme de syndrome métabolique. De plus, l'occurrence d'une croissance accélérée ou d'un rattrapage du retard de croissance en période postnatale semble renforcer les effets délétères de l'environnement fœtal (Hales and Ozanne, 2003).

Suite à l'émission de l'hypothèse de Barker, les premières pathologies à avoir attiré l'attention des épidémiologistes furent, *de facto*, les maladies cardiovasculaires. Barker et ses associés poursuivirent leurs travaux et établirent clairement l'influence de l'environnement intra-utérin sur la pression artérielle dès la fin des années 80. Deux études réalisées chez des enfants pré-pubères âgés de 10 ans ainsi que chez des adultes nés en Grande Bretagne entre 1935 et 1946 et figurant dans les registres hospitaliers furent particulièrement importantes (Barker *et al.*, 1989; Barker *et al.*, 1990). La première étude portait sur 9921 enfants nés en avril 1970 et inclus dans le programme « British births survey » (Chamberlain and Davey, 1975), ainsi que sur 3259 adultes (36 ans) nés et résidant en Angleterre, au Pays de Galles, et en Ecosse (Barker *et al.*, 1989). Les auteurs décrivent une augmentation de la pression systolique de 0,38 et 1,32 mm Hg entre les enfants, respectivement de sexe masculin et féminin, appartenant au plus grand et au plus petit tertile des poids de naissance. Chez les adultes, l'augmentation de la pression systolique était plus prononcée chez les individus ayant eu un faible poids de naissance, à savoir 2,57 mm Hg chez les hommes et 1,83 mm Hg chez les femmes. Dans la deuxième étude portant sur 449 adultes (46 à 54 ans) nés à Preston entre 1935 et 1943, la pression artérielle moyenne augmentait de 11 mm Hg pour une réduction du poids de naissance de  $> 7,5$  à  $\leq 5,5$  livres (Barker *et al.*, 1990). Cette augmentation de la pression artérielle systolique inversement proportionnelle au poids de naissance était indépendante de l'âge gestationnel, suggérant l'implication exclusive d'une réduction de la croissance fœtale. S'en est suivi un grand nombre d'études prospectives et de cohortes démontrant l'augmentation de la prévalence de pathologies cardiovasculaires, telles que l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension artérielle, chez les individus à faible poids de naissance dans différents pays (Barker, 2002; Eriksson, 2006).

De la même façon, un grand nombre d'études épidémiologiques convergent vers l'existence d'un lien entre retard de croissance précoce et le développement de troubles du métabolisme glucidique à l'âge adulte, comprenant intolérance au glucose, résistance à l'insuline, et diabète de type II (de Rooij *et al.*, 2006b; de Rooij *et al.*, 2006d; Eriksson, 2006; Kyle and Pichard, 2006; Ozanne and Hales, 2002a; Ozanne and Hales, 2002b; Ravelli *et al.*, 1998). Par exemple, dans la première étude menée à Hertfordshire en 1991 sur 370 hommes âgés de 59 à 70 ans, 40% des individus dont le poids de naissance était inférieur ou égal à 2,5 kg présentaient des altérations de la tolérance au glucose ou un diabète de type II, contre seulement 14% chez les gros bébés ( $\geq 4,3$  kg) (Hales *et al.*, 1991). En tenant compte des effets concomitants de l'obésité à l'âge adulte chez les sujets étudiés, les auteurs concluent à une augmentation du risque de développer des troubles du métabolisme glucidique d'un facteur six chez les individus à faible poids de naissance. Une relation similaire fut observée avec le poids à 1 an. De la même façon que pour l'augmentation de la pression artérielle dans l'étude réalisée à Preston (Barker *et al.*, 1990), cette association entre RCIU et diabète de type II était indépendante de l'âge gestationnel. Ceci suggère une fois de plus l'influence majeure des conditions environnementales sur le développement fœtal et postnatal précoce ainsi que sur la programmation de pathologies (Phipps *et al.*, 1993).

Bien que toutes les études épidémiologiques ne convergent pas vers les mêmes conclusions, l'influence de l'environnement nutritionnel périnatal sur l'incidence de l'obésité reste cependant d'actualité. En effet, une augmentation de la masse grasse ainsi que de l'oxydation des lipides ont été notées dans une partie des analyses publiées (Tappy, 2006). L'influence de la nutrition au cours de la vie fœtale et postnatale précoce (0-3 ans) semble donc avoir un impact limité sur l'adiposité à l'âge adulte (Martorell *et al.*, 2001). Par ailleurs, et bien que les critères utilisés restent discutables selon les différentes études, une croissance « trop » rapide au cours de l'enfance semble être le déterminant le plus associé à l'augmentation de la prévalence de l'obésité (Monteiro and Victora, 2005). Dans leur étude remarquable comparant l'occurrence du rebond d'adiposité classiquement présent chez l'enfant entre 5 et 7 ans et le développement ultérieur d'une obésité, Rolland-Cachera et coll. ont clairement établi l'influence de l'accélération de la cinétique du rebond sur l'apparition d'une obésité. Toutefois, les auteurs ont noté que les conditions nutritionnelles périnatales ainsi que l'indice de masse corporelle avant le rebond avaient un impact sur sa cinétique (Rolland-Cachera *et al.*, 2006). La dénutrition précoce agirait donc aussi indirectement en favorisant l'établissement d'un profil d'adiposité accéléré ayant lui-même des conséquences sur le développement d'une obésité, comme le corrobore une étude

récente réalisée aux USA (Stettler *et al.*, 2005).

Les effets de la croissance périnatale sur les troubles du métabolisme des lipides sont tout autant ouverts à discussion. Barker et coll. ont cependant démontré une augmentation de la cholestérolémie de 0,25 mmol/L pour une diminution de 2,54 cm de la circonférence abdominale<sup>9</sup> dans une étude portant sur 219 hommes et femmes nés à l'hôpital de Jessop entre 1939 et 1940 (Barker *et al.*, 1993c). Selon les auteurs, ces effets pourraient être liés à des altérations du développement ainsi que du métabolisme hépatique des lipoprotéines. Bien que les effets ne semblent pas être systématiques, un certain nombre d'études ont tout de même corroboré ces résultats en démontrant l'existence d'un lien entre croissance précoce et développement d'une dyslipidémie durant l'enfance (Barker *et al.*, 1993b) ainsi qu'à l'âge adulte (Sinclair *et al.*, 2007).

Comme le montrent les études concernant les différentes famines au cours du vingtième siècle, la dénutrition maternelle semble être une des causes premières du RCIU et un des facteurs les plus répandus de programmation, puisque liée aux conditions économiques (figure 3A) ainsi qu'à l'occurrence de guerres. L'UNICEF<sup>10</sup> a récemment publié un rapport<sup>11</sup> alarmant estimant que parmi les enfants de moins de 5 ans, 27% présentent un retard de croissance (soit 146 millions) dont la moitié vit en Asie du sud (figure 3B et 3C). Bien que les pays en voie de développement offrent malheureusement un terrain d'étude idéal, l'absence d'enregistrement systématique des données biométriques liée à une difficulté évidente de collection a retardé l'exploitation, entendons nous bien statistique, de telles populations. Au contraire, les périodes de dénutrition globale d'une population bien définie au cours des différents conflits modernes ont fourni un modèle épidémiologique exploitable de programmation des pathologies associées au syndrome métabolique (Kyle and Pichard, 2006; St Clair *et al.*, 2005). Par exemple, les individus nés durant la famine d'Amsterdam avec un faible poids, et qui ont donc connu une dénutrition maternelle pré/périnatale, présentent une augmentation de la prévalence de pathologies apparentées au syndrome métabolique (hypertension, maladies cardiovasculaires, diabète de type II) (de Rooij, Sr. *et al.*, 2006d; Kyle and Pichard, 2006). L'ensemble de ces observations a donné naissance à

---

<sup>9</sup> Critère utilisé pour évaluer un retard de croissance intra-utérin

<sup>10</sup> United Nations Children's Fund (fond des nations unies pour l'enfance)

<sup>11</sup> « Progrès pour les enfants », UNICEF, Avril 2002 (<http://www.unicef.fr/mediastore/7/1767-4.pdf>)

l'hypothèse du « thrifty phenotype », littéralement « phénotype économe », qui propose qu'une sous-nutrition périnatale résulte en la mise en place de mécanismes d'économie nutritionnelle au cours du développement qui ont un impact sur la croissance des organes, programmant ainsi une sensibilité ultérieure accrue aux effets délétères d'un environnement nutritionnel plus favorable ou surabondant (Hales and Barker, 2001; Hales and Barker, 1992). En 1962, JV Neel avait déjà proposé l'hypothèse du « thrifty génotype » pour expliquer la recrudescence et la persistance du diabète de type II dans des populations traditionnelles, comme celles de l'île de Nauru<sup>12</sup> (Dowse *et al.*, 1991) et des indiens Pima d'Arizona (McCance *et al.*, 1994a; McCance *et al.*, 1994b) ; hypothèse selon laquelle les gènes qui confèrent un avantage de survie face à des conditions nutritionnelles restreintes deviennent diabétogènes en temps de nutrition adéquate ou excessive (Neel, 1962). A l'inverse, un régime hypercalorique au cours de la gestation ainsi que de la lactation semble aussi programmer l'apparition de pathologies liées au syndrome métabolique, étiologiquement reliées à une résistance à l'insuline (Das, 2005). La nutrition au cours des différentes périodes du développement de l'organisme joue donc un rôle prépondérant quant au maintien, à long terme, de l'homéostasie énergétique et cardiovasculaire.

---

<sup>12</sup> Micronésie

### La faim dans le monde

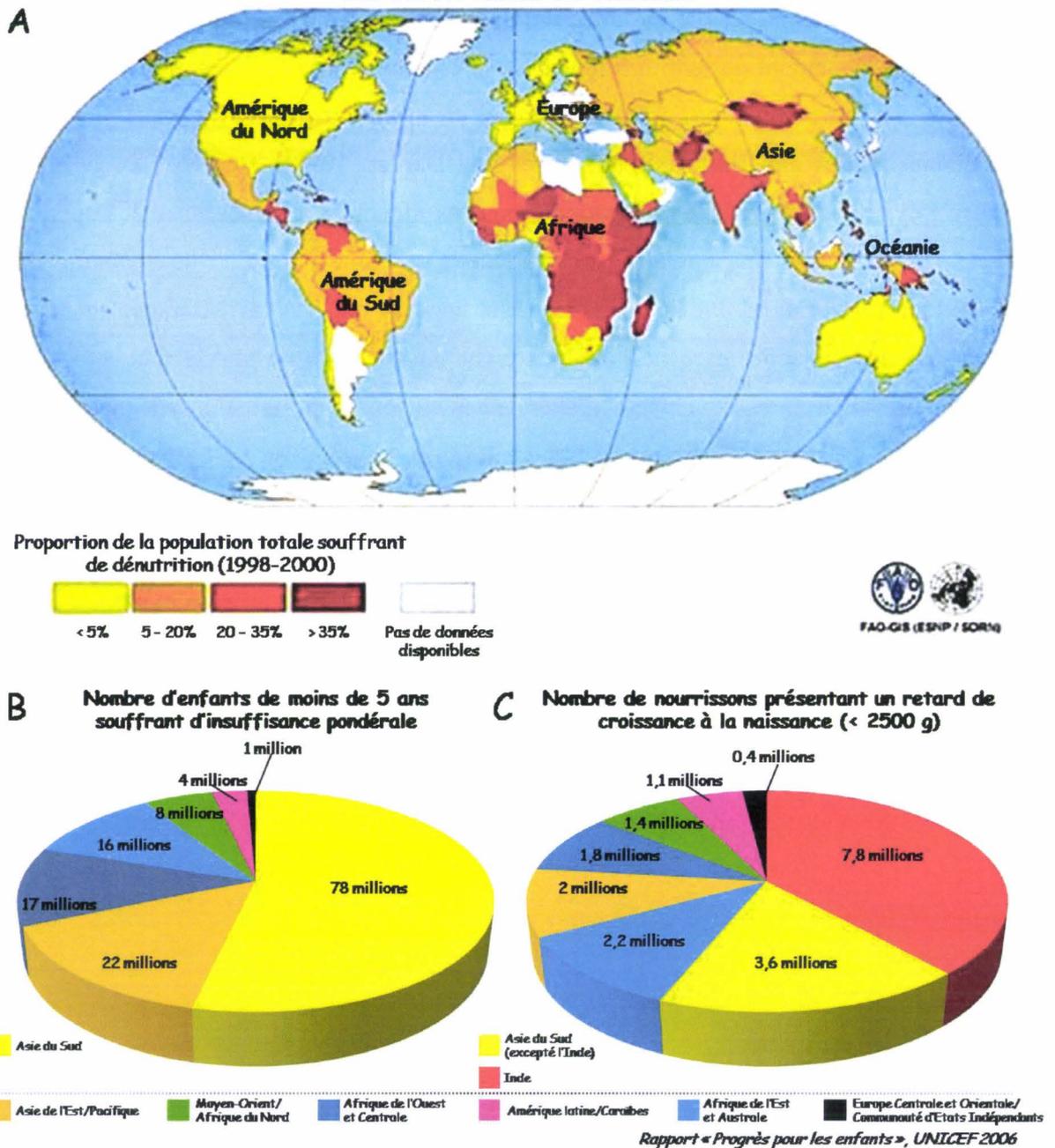


Figure 3 : La faim dans le monde. A : planisphère présentant l'évaluation par la FAO<sup>13</sup> (1998-2000) du pourcentage moyen de la population souffrant de dénutrition dans différents pays. B et C : Evaluation par l'UNICEF (du nombre d'enfants de moins de 5 ans en insuffisance pondérale (B, 1996-2005) ainsi que du nombre de nouveau-nés présentant un RCIU (C, 1998-2004)

<sup>13</sup> Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

La croissance et la nutrition fœtale ont depuis longtemps été reconnues comme étant soumises à la qualité des échanges fœto-placentaires, comme le montre la corrélation positive entre le poids de naissance et celui du placenta (Kloosterman, 1970). Depuis quelques années, un nombre croissant de données épidémiologiques semble indiquer que le poids du placenta, qui renseigne aussi sur sa structure et ses capacités d'échanges, est un facteur majeur pour la santé future de l'individu (Godfrey, 2002). En effet, un défaut de croissance placentaire et d'augmentation de l'afflux sanguin maternel, qui conduit à une « insuffisance placentaire », représenteraient les mécanismes d'apparition d'un RCIU le plus commun dans les pays occidentalisés. Certaines données cliniques indiquent même qu'un RCIU est presque systématiquement précédé d'une réduction de la taille du placenta (Hafner *et al.*, 2003). A l'inverse, dans l'étude réalisée à Preston par Barker en 1990, une augmentation du poids placentaire de moins d'1 livre à plus d'1,5 livres était associée à un accroissement de la pression artérielle moyenne de 15 mm Hg, avec un effet accentué chez les individus combinant faible poids de naissance et gros placenta (Barker *et al.*, 1990). Ces résultats corroborent ceux obtenus au cours de la famine d'Amsterdam, ou une dénutrition sévère en début de grossesse associée à un apport énergétique augmenté en fin de grossesse entraîne une augmentation du poids placentaire associée à un risque accru de pathologies tardives (Lumey, 1998). Ainsi, l'ensemble de ces données converge vers une implication double du placenta, à la fois soumis à l'environnement fœto-maternel et l'influençant : un défaut de sa croissance entraînerait un RCIU, tandis qu'un RCIU induirait son hypertrophie (Jansson and Powell, 2007).

Bien que l'analyse des données épidémiologiques ait permis d'identifier l'influence de l'environnement périnatal sur la prédisposition au développement des pathologies métaboliques et cardiovasculaires, la compréhension des mécanismes sous-jacents nécessitait la mise au point de modèles animaux systématisés de programmation permettant des études plus invasives et extensives.

## I.A.2. Modèles animaux de programmation

### I.A.2.1. *Les différents modèles de retard de croissance*

Dès la fin des années 80, la nécessité de développer des modèles animaux de retard de croissance intra-utérin et précoce devint évidente, ceci afin de reproduire des symptômes du syndrome métabolique. La proximité des programmes d'expression génique ainsi que des profils de différenciation cellulaire et d'organogenèse au cours du développement au sein des mammifères, voire du règne animal pour certains (Singer, 2004), permettrait d'établir des parallèles avec les données collectées chez l'homme et d'identifier les mécanismes impliqués dans la genèse de ces symptômes.

Comme les premières études épidémiologiques faisant état d'un lien entre faible poids de naissance et syndrome métabolique portèrent sur des populations dénutries, l'idée de développer des modèles animaux de dénutrition précoce germa rapidement. Les premiers travaux de manipulation nutritionnelle réalisés sur l'animal et ayant un effet de programmation remontent à l'année 1973. Ils montraient une augmentation du cholestérol plasmatique à long terme (215 et 254 jours postnataux) chez des rats sevrés prématurément<sup>14</sup> et soumis à un régime hyperglucidique ou classique de laboratoire (Hahn and Kirby, 1973). Par la suite, un grand nombre de modèles plus caractéristiques de retard de croissance et découlant d'une restriction nutritionnelle maternelle a vu le jour. Ils diffèrent les uns des autres par l'espèce animale, la nature du stress nutritionnel employé (restriction énergétique, protéique) et sa sévérité, et également par la durée et la période durant laquelle la dénutrition est appliquée (pré et/ou postnatale). Quoi qu'il en soit, ces manipulations diverses semblent toutes reproduire la programmation de certains symptômes métaboliques et cardiovasculaires associés au syndrome métabolique. Par exemple, une restriction énergétique de 50% de la troisième et dernière semaine de gestation au sevrage chez le rat (Blondeau *et al.*, 2001; Garofano *et al.*, 1999), de 50% du 12,5<sup>ème</sup> au 18,5<sup>ème</sup> jours de gestation (20 jours) chez la souris (Jimenez-Chillaron *et al.*, 2005), de 50% du 110<sup>ème</sup> jour de gestation au terme (jour 147) chez le mouton (Gardner *et al.*, 2005), ou encore de 30% durant toute la gestation (65 jours) chez le cobaye (Kind *et al.*, 2003), induisent à l'âge adulte des modifications du métabolisme glucidique caractéristiques d'une intolérance au glucose ou d'une résistance à

---

<sup>14</sup> Les rats étaient sevrés au 14<sup>ème</sup> jour de lactation, qui dure classiquement 21 jours chez le rat.

l'insuline. Des effets comparables sont retrouvés dans des modèles de dénutrition protéique (Ozanne and Hales, 2002b), tels que l'administration d'un régime contenant 8% de protéines (au lieu de 20 % habituellement) au cours de la lactation chez le rat (Fagundes *et al.*, 2007). Parallèlement, de profondes perturbations du métabolisme cardiovasculaire ont pu être observées à court et long terme chez des animaux dénutris précocement. Par exemple, une augmentation de la pression artérielle est retrouvée après une dénutrition énergétique de 30% du 10<sup>ème</sup> jour embryonnaire à la parturition chez la souris (Kawamura *et al.*, 2007), de 70% au cours de la gestation chez le rat (Rivière *et al.*, 2005), de 50% durant les 30 derniers jours de gestation chez le mouton (Edwards and McMillen, 2001), ainsi que de 15% quatre semaines avant et au cours de la gestation chez le cobaye (Kind *et al.*, 2002). Par ailleurs, afin de reproduire les effets épidémiologiques du style de vie dit moderne ou de société occidentale, un certain nombre d'équipes a utilisé des modèles associant un retard de croissance et un régime surabondant en différents nutriments au cours des périodes de la vie. Par exemple, l'administration d'un régime riche en lipides à partir du sevrage à des animaux ayant subi une restriction protéique (régime à 5% de protéines) durant la gestation et la lactation, aggrave, à 6 mois, l'augmentation de la pression systolique observée chez les animaux dénutris ayant eu accès à une nourriture classique (Souza-Mello *et al.*, 2007).

Une autre cause étiologique des RCIU consiste en une réduction des échanges sanguins entre le placenta et le fœtus, souvent liée à une diminution du flux sanguin maternel dirigé vers le placenta, ce qui limite ainsi la disponibilité des nutriments et le renouvellement de l'oxygène dans le sang fœtal et entraîne un RCIU. Par conséquent, des modèles de ligature bilatérale de l'artère utérine au cours de périodes courtes de la gestation ont été élaborés. Une telle intervention pratiquée chez des rates gestantes entraîne, chez la descendance adulte, des altérations du métabolisme glucidique (Wolf, 2003) ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle systolique en conditions basales ainsi qu'en réponse à un stress olfactif (Schreuder *et al.*, 2006), et semble donc être un modèle valide de programmation.

Parallèlement, des manipulations visant à réduire la pression en oxygène du milieu afin de mimer les effets d'une détresse fœtale ont produit le modèle d'hypoxie prénatale. En effet, le métabolisme cellulaire est dépendant de la disponibilité des nutriments d'une part et de l'oxygène d'autre part. En gynécologie et obstétrique, cette fourniture en oxygène est le plus souvent liée à celle en nutriments, puisque principalement dépendante des capacités d'échange du placenta. Cependant, une réduction sélective de la disponibilité en oxygène dans le sang fœtal peut découler

d'une réduction de la pression en oxygène dans le sang maternel, dépendant notamment d'une inhalation excessive de monoxyde de carbone (tabagie) ou d'une pathologie pulmonaire/érythrocytaire. De la même façon qu'une limitation de la fourniture en « combustible » (nutriments), la limitation en « comburant » (oxygène) entraîne aussi un RCIU dont découle, par exemple, la programmation de troubles cardiovasculaires (Zhang, 2005).

Au sein des populations issues des grandes famines au cours des différentes guerres modernes, la nutrition maternelle ne semble pas être la seule perturbation possible de l'environnement et de la croissance fœtale. En effet, les conditions de stress de la femme gestante, renforcées entre autre en période de guerre, ainsi que l'administration de glucocorticoïdes<sup>15</sup> en médecine prénatale ont une influence telle sur le développement du fœtus qu'elles peuvent entraîner un RCIU (Seckl, 2001). Chez l'homme, les effets à long terme d'une administration de glucocorticoïdes exogènes sont encore très peu documentés, mais il apparaît que chez les enfants traités, le plus souvent au cours du dernier trimestre de gestation, des détériorations neuro-développementales ainsi que des troubles légers du développement psychosocial et psychomoteur sont plus fréquemment retrouvés (Finer *et al.*, 2000; Lajic *et al.*, 1998; Trautman *et al.*, 1995). L'élaboration de modèles de RCIU par injections, uniques ou répétées, de dexaméthasone<sup>16</sup> ou encore à l'aide de protocoles de stress maternel au cours de la gestation a grandement contribué à l'étude des mécanismes impliqués dans la programmation fœtale (Lesage *et al.*, 2006; Seckl and Meaney, 2006). Par exemple, l'administration de 100µg Dex/kg/jour du 15<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de gestation chez le rat entraîne une augmentation de la pression artérielle de 10 mm Hg dès l'âge de 4 mois (Woods and Weeks, 2005). A l'inverse, ces modifications ne sont pas retrouvées après l'injection des mêmes quantités de dexaméthasone durant les 10 premiers jours de gestation, posant la question de la fenêtre de sensibilité des différents systèmes homéostatiques aux conditions environnementales.

---

<sup>15</sup> Hormones dites « du stress » et sécrétées par l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien ou corticotrope (discuté ci-après).

<sup>16</sup> Analogue de synthèse des glucocorticoïdes

*Notion de fenêtre de programmation : ontogenèse et environnement*

Si l'on considère le nourrisson humain dans sa globalité, il est communément noté qu'une dénutrition fœtale précoce entraîne un retard de croissance proportionné, tandis qu'une dénutrition plus tardive au cours du développement résulte en une croissance non seulement réduite mais également disproportionnée, comprenant des altérations sélectives de certains organes. Il en va de même chez une grande variété d'espèces animales (McCance and Widdowson, 1974). En effet, bien que la mise en place des différents organes du fœtus se fasse assez rapidement au cours de l'ontogenèse, la croissance et la différenciation fonctionnelle de ces derniers continuent jusqu'à la naissance, afin d'assurer l'autonomie du nouveau-né, et au delà. Les derniers organes à arriver à maturité sont bien évidemment les organes sexuels et le système nerveux central (SNC). Ces périodes de mise en place étant largement différentes et chevauchantes selon le ou les organes considérés, les effets découlant d'une altération de l'environnement dépendront donc de la période du développement affectée.

Les travaux réalisés par Marion Léonhardt au sein de notre laboratoire ont bien illustré ces modifications sélectives chez le rat (Leonhardt *et al.*, 2002). Une dénutrition maternelle de 50% du 14<sup>ème</sup> jour embryonnaire au sevrage, de la naissance au sevrage, ou encore du 14<sup>ème</sup> jour embryonnaire à la naissance entraîne un retard de croissance chez la descendance au sevrage. Bien que le poids du thymus et du foie soient réduits dans les 3 modèles, seuls les deux premiers (qui incluent la lactation) produisent une atrophie des glandes surrénales au sevrage. Toujours chez le rat, Chamson-Reig et coll. ont montré des différences dans la gravité des altérations du pancréas entraînées par un régime hypoprotéique suivant qu'il est administré au cours de la gestation ou durant certaines semaines de la lactation (Chamson-Reig *et al.*, 2006).

De façon similaire, les effets à long terme des conditions périnatales sont conditionnés par la période où celles-ci sont délétères. Dans leur revue portant sur la famine d'Amsterdam, Kyle et coll. ont bien résumé les effets pathogènes différentiels d'une dénutrition en fonction de la période affectée, comme le montre le tableau 1 (Kyle and Pichard, 2006). Chez le rat, une restriction protéique isocalorique de 50% entraîne des modifications différentes du métabolisme du glucose à 110 jours de vie postnatale, en fonction que la dénutrition est imposée au cours de la gestation, de la lactation, ou des deux (Zambrano *et al.*, 2006). De la même façon, une exposition à la dexaméthasone du 27<sup>ème</sup> au 29<sup>ème</sup> jour de gestation chez le mouton entraîne une hypertension à l'âge adulte, contrairement à une administration réalisée au 64<sup>ème</sup> jour (Gatford *et al.*, 2000).

Symptomatologie	Exposition à la famine			
	au cours de la gestation			au cours de l'enfance
	précoce	moyenne	tardive	
Intolérance au glucose		x	x	
Obésité	x			
Maladies cardiaques coronaires	x			
Profil lipidique athérogène	x			
Troubles de la coagulation	x			
Hypertension			x	
Microalbuminurie		x		
Maladies obstructives respiratoires		x		
Schizophrénie	x			
Désordres apparentés à la schizophrénie	x			
Anomalies congénitales du système nerveux central	x			
Troubles antisociaux	x			
Cancer du poumon		x	x	
Ménopause précoce				x
Altérations de fonctions reproductrices				x
Perturbations de l'axe IGF-1				x

Kyle et al., 2006

Tableau 1 : Conséquences à long terme de l'exposition précoce à une dénutrition au cours de la famine d'Amsterdam. IGF-I : Insulin-like Growth Factor-I.

L'ensemble de ces données a permis d'aboutir à la notion de « fenêtres de programmation » qui correspondent donc à des périodes de l'ontogenèse durant lesquelles certains organes ou axes homéostatiques en développement sont plus sensibles aux conditions environnementales. Si ces conditions se trouvent perturbées, les conséquences tissulaires seront fonction de la période envisagée et conditionneront les adaptations ou més-adaptations allostatiques<sup>17</sup> de l'organisme à long terme. Ainsi, les modèles de programmation faisant varier la période d'intervention au cours du développement ont pu témoigner de la différence de sensibilité des systèmes en fonction du temps. Ceci a contribué à l'identification et à la meilleure appréhension des mécanismes sollicités par la programmation.

<sup>17</sup> Le terme adaptation définit l'ensemble des changements concourant au maintien d'un équilibre préexistant (homéostasie) ou à l'élaboration d'un nouvel équilibre (allostasie) (« De l'homéostasie à l'allostasie », Richebé et Simonnet 2005, <http://www.reanesth.org/spip/IMG/pdf/RichebeSimonnet-3.pdf>)

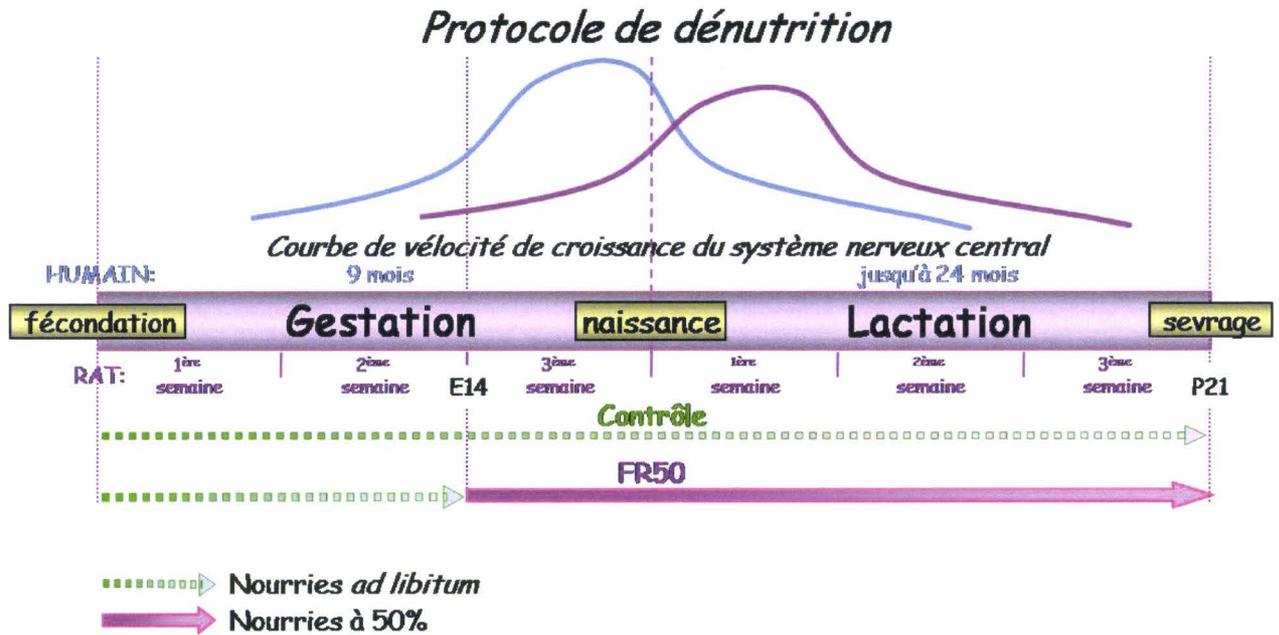
---

*I.A.2.2. Le modèle FR50*

Afin de contribuer à la compréhension des mécanismes de la programmation précoce des pathologies chroniques, notre équipe a développé un modèle de restriction alimentaire maternelle de 50% s'étendant de la dernière semaine de gestation jusqu'au sevrage chez le rat Wistar (modèle FR50). A ce jour, l'une des contributions majeures de l'étude de ce modèle de programmation fut de mettre en évidence l'existence d'altérations précoces de l'axe corticotrope au cours d'une dénutrition, altérations qui mènent à une dérégulation de l'activité de l'axe à l'âge adulte. En parallèle, un certain nombre d'études réalisées sur le modèle FR50, dont celle présentée dans cette thèse, a contribué à l'identification de nouvelles cibles possibles de la programmation.

*Restriction alimentaire et protocole expérimental*

Chez l'homme, la courbe de vélocité de croissance du cerveau connaît une période d'accélération critique durant l'ontogenèse, qui se situe majoritairement au cours de la vie fœtale en s'étendant du 5<sup>ème</sup> mois de grossesse au 2<sup>ème</sup> mois de vie extra-utérine (figure 4). C'est au cours de cette période que se met en place la majorité des grands axes neuroendocriniens et des connexions nerveuses qui les contrôlent. A l'inverse, dans les espèces murines, le SNC du fœtus reste relativement immature jusqu'à la naissance et son développement a principalement lieu au cours de la période post-natale précoce. En effet, chez le rat la croissance rapide du cerveau est initiée quelques jours avant la naissance et ralentie au cours de la deuxième semaine de vie extra-utérine (figure 4). La période de restriction alimentaire du modèle FR50 encadre donc parfaitement la fenêtre critique de croissance rapide du cerveau chez le rat (figure 4). Le régime FR50 constitue donc un modèle d'étude adéquat pour la caractérisation des effets d'une dénutrition précoce sur la mise en place et l'activité des axes neuroendocriniens potentiellement impliqués dans la programmation, dont l'axe corticotrope.



**Figure 4 :** *Protocole de dénutrition maternelle périnatale de 50%.* La restriction alimentaire maternelle de 50 % (FR50) s'étend de la dernière semaine de gestation (E14) au sevrage (P21), ce qui correspond parfaitement à la fenêtre de croissance rapide du SNC chez le rat, et représente donc une période critique de l'ontogenèse

#### *Retard de croissance précoce*

En accord avec les données épidémiologiques, la condition sinéquanone à toute étude portant sur la programmation nutritionnelle de pathologies à long terme est la caractérisation d'une perturbation de la croissance précoce, ayant titre de retard, ou d'accélération, comme il est observé dans le diabète gestationnel ou l'obésité maternelle (Curhan *et al.*, 1996; Krishnaveni *et al.*, 2005; Reusens and Remacle, 2006). En effet, l'application du régime FR50 à des femelles gestantes prévient la prise de poids communément observée chez les animaux témoins au cours de la dernière semaine de gestation (figure 5). Du point de vue fœtal, les animaux FR50 présentent une réduction du poids corporel dès P4 ce qui est caractéristique d'un retard de croissance précoce (figure 5). Lesage et coll. avaient cependant observé un RCIU chez les animaux FR50 (Lesage *et al.*, 2001). Cette différence s'expliquerait vraisemblablement, d'une part, par la variation du nombre de fœtus par portée (un nombre réduit favorisant la croissance fœtale et atténuant ainsi le RCIU), et, d'autre part, par le nombre plus restreint d'animaux inclus dans notre étude. De plus, le retard de développement somatique des animaux FR50 s'accroît au cours de la lactation et atteint son maximum au sevrage. Ainsi, une dénutrition maternelle de 50% de la dernière semaine de gestation au sevrage constitue un modèle de retard de développement précoce. Ce modèle

fournit donc une base expérimentale pour l'étude des mécanismes impliqués dans la programmation. Par ailleurs, le retard de croissance des animaux FR50 semble irréversible puisque ces derniers conservent un poids corporel réduit au cours de la vie adulte (4 et 8 mois) et du vieillissement (24 mois) par rapport à des animaux témoins.

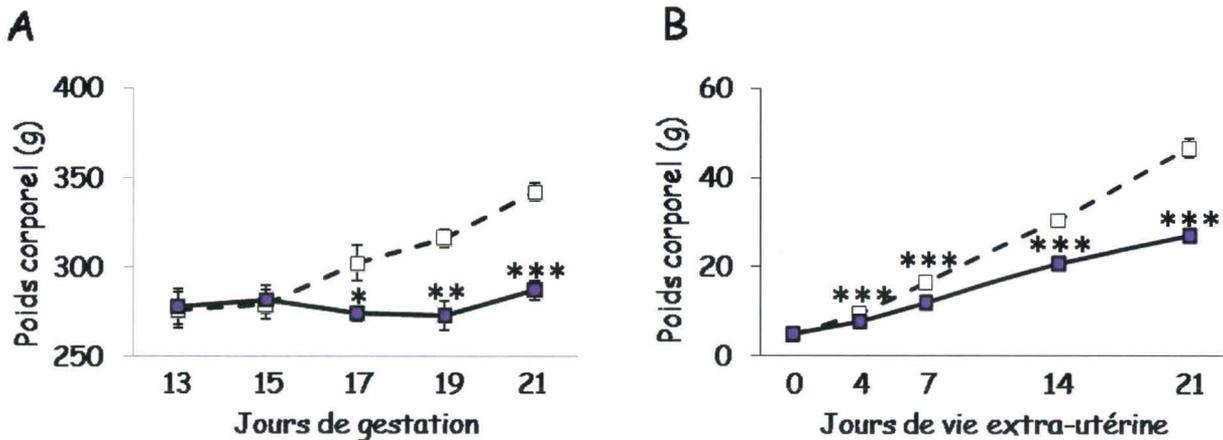


Figure 5 : Effets du régime FR50 sur la prise de poids des rattes gestantes et des nouveau-nés. A : Masse pondérale des rattes gestantes témoins (ligne pointillée) et FR50 (ligne continue) du début de la restriction alimentaire (14<sup>ème</sup> jour gestationnel) à la parturition (21<sup>ème</sup> jour). B : Masse pondérale des animaux témoins et FR50 de la naissance (jour 0) au sevrage (21<sup>ème</sup> jour). \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  témoins vs. FR50

#### Altérations de l'équilibre neuroendocrinien et métabolique

Les travaux réalisés sur le modèle FR50 ont permis de caractériser des altérations et des adaptations du développement des organes impliqués dans différents axes neuroendocriniens, en particulier les axes corticotrope et gonadotrope, et dans le contrôle du métabolisme.

En ce qui concerne le métabolisme glucidique, les travaux réalisés en collaboration avec l'unité INSERM 457 de l'hôpital Robert Debré (Paris) dirigée par le professeur Paul Czernichow ont montré, dès la fin de la gestation (E21), une réduction de la masse du pancréas ainsi que du contenu en insuline chez les fœtus FR50 (Blondeau *et al.*, 2001). Par ailleurs, le maintien du taux de corticostérone à un niveau basal à l'aide d'une micro-pompe implantée chez des rattes FR50 surrénalectomisées au 13<sup>ème</sup> jour de gestation rétablit la masse des cellules  $\beta$  et le contenu pancréatique chez le fœtus (Blondeau *et al.*, 2001a). Quoi qu'il en soit, la glycémie du fœtus FR50 n'est pas affectée à terme, et ce bien que celle de la mère ainsi que l'expression placentaire de la protéine GLUT3 soient réduites (Lesage *et al.*, 2002b). Ces modifications de la croissance et de l'activité du pancréas semblent donc constituer des adaptations à la disponibilité limitée du

glucose qui permettent le maintien de la glycémie. Il est intéressant de noter que ces résultats corroborent la théorie du « thrifty phénotype ». Au sevrage, Léonhardt et coll. ont pu montrer une réduction des taux plasmatiques de glucose et d'insuline chez les animaux FR50 (Léonhardt, 2003). A l'inverse, les rats mâles FR50 âgés de 4 mois présentent, dans des conditions sans mise à jeun (entre 9h et 10h), une hyperinsulinémie sans modifications de la glycémie, ce qui pourrait éventuellement suggérer une sensibilité réduite à l'insuline (données non publiées). Par ailleurs, des travaux réalisés par Garofano et coll. ont pu montrer qu'à 12 mois, le profil glucidique des animaux FR50 est encore aggravé, avec une insulino-déficience marquée ainsi qu'une profonde intolérance au glucose (Garofano *et al.*, 1999a; Garofano *et al.*, 1999b). De plus, la réduction de la masse des cellules  $\beta$  observée précocement est retrouvée à 12 mois. Ainsi, le régime FR50 induit des adaptations précoces du contrôle de l'homéostasie glucidique qui participent à l'établissement tardif d'un profil de diminution de la capacité d'insulino-sécrétion pouvant mener à la programmation d'un diabète de type II (Phillips *et al.*, 1994; Simmons *et al.*, 2001).

De nombreuses études se sont également intéressées aux altérations du métabolisme lipidique dans ce modèle. Parmi celles-ci figure une réduction de l'ensemble des dépôts adipeux chez les animaux FR50 au sevrage, comprenant le tissu adipeux blanc périrénal, pectoral, gonadique et inguinal, ainsi que le tissu adipeux brun (Leonhardt *et al.*, 2003). Il n'est alors pas étonnant que ces animaux présentent également une diminution du taux plasmatique de leptine puisque cette dernière est produite proportionnellement à la masse des adipocytes (Considine *et al.*, 1996; Considine and Caro, 1997). Ces résultats concordent avec la réduction de l'apport nutritionnel au cours de la période périnatale. En effet, la constitution des réserves énergétiques va être doublement entravée, d'une part par la limitation de l'apport énergétique, et d'autre part par le détournement du métabolisme périphérique vers l'utilisation préférentielle des lipides entraînant une mobilisation accrue des réserves. Bien que la réduction de la masse grasse périrénale et gonadique persiste chez les animaux FR50 âgés de 4 mois, elle ne semble pas entraîner de perturbation des taux plasmatiques de leptine (Léonhardt, 2003), ce qui suggère une hyperactivité sécrétrice des adipocytes à ce stade. Dans l'ensemble, une restriction nutritionnelle imposée au cours de la gestation tardive et de la lactation perturbe la constitution des réserves lipidiques ainsi que les taux plasmatiques de leptine au sevrage, alors que, chez les jeunes adultes, ces modifications de l'homéostasie lipidique semblent moins marquées.

Comme le montre très clairement une étude réalisée par Sebaai et coll. en 2002, le régime FR50 entraîne également des perturbations de l'homéostasie hydrominérale et hémodynamique à

l'âge adulte (Sebaai *et al.*, 2002a). D'un point de vue somatique, la masse des reins et des surrénales est réduite chez les animaux FR50 âgés de 4 mois. Une réduction de la densité sanguine en globules rouges (hématocrite) est également observée chez ces animaux. De plus, bien que les taux plasmatiques d'AVP et d'aldostérone augmentent suite à une dénutrition périnatale, l'osmolarité sanguine ne subit pas de modifications. La concentration en facteur atrial natriurétique (ANF) ainsi que l'activité plasmatique de la rénine ne sont quant à elles pas affectées par la dénutrition périnatale. De plus, chez les animaux dénutris précocement, la réponse des taux d'AVP, d'ANF et d'aldostérone à un stress de déshydratation est altérée comparativement à ce qui est observé chez les rats témoins. Ces altérations sont associées à la modulation de l'expression, de la densité ainsi que de l'affinité des récepteurs à l'ANF spécifique aux différents sous-types présents dans le rein et le cortex surrénalien. Au niveau central, bien que la dénutrition maternelle périnatale n'affecte pas le niveau basal d'expression de l'AVP dans le NPV et le noyau supra-optique (NSO) de l'hypothalamus, elle résulte cependant en une altération de la réponse du taux d'acide ribonucléique messager (ARNm) après un stress de déshydratation. Globalement, en considérant les fonctions de ces différents acteurs dans la régulation de l'homéostasie hydrominérale (de Bold *et al.*, 1981; Maack and Kleinert, 1986; Peach, 1977; Verrey *et al.*, 1995), l'augmentation des hormones hypertensives, telles que l'AVP et l'aldostérone, pourrait perturber cet équilibre chez les animaux FR50 et ainsi concourir à l'établissement d'une hypertension à long terme.

Bien que le régime FR50 induise une réduction de la prise alimentaire durant les quatre premières semaines suivant le sevrage, la quantité de nourriture ingérée par les animaux dénutris précocement se normalise dès la 8<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale et reste comparable à celle des rats témoins chez l'adulte (Léonhardt, 2003). Au niveau central, la dénutrition maternelle périnatale entraîne des modifications du système cannabinoïde orexigène, les animaux FR50 présentant une réduction de l'expression hypothalamique de l'anandamide (Matias *et al.*, 2003a). Ces résultats sont cohérents avec la diminution de la prise alimentaire notée chez ces animaux, et ce malgré la réduction des taux de leptine et d'insuline. Chez l'adulte, la normalisation de la prise alimentaire s'accompagne d'un rétablissement de l'expression de ce gène impliqué dans son contrôle au niveau central (Matias *et al.*, 2003b). La dénutrition maternelle périnatale de 50% entraîne donc des altérations précoces de l'expression génique et du comportement alimentaire sans pour autant modifier de façon notable la régulation de la prise alimentaire à long terme chez la descendance. Enfin, des travaux récents réalisés au sein du laboratoire permettent d'établir que le régime FR50

entraîne des modifications de la mise en place du système POMC anorexigène ainsi que de ses connexions hypothalamiques. Ces modifications pourraient être dépendantes de la réduction de la leptine circulante chez les animaux FR50 (Delahaye *et al.* 2007, soumis à *Endocrinology*).

Globalement, la dénutrition maternelle périnatale de 50% induit des modifications de la mise en place et de l'activité de différents systèmes impliqués dans l'homéostasie énergétique et cardiovasculaire. Il en résulterait une réinitialisation de l'équilibre métabolique et neuroendocrinien adaptée aux conditions précoces délétères. Une fois l'organisme confronté à un environnement « plus favorable » au cours du vieillissement, ces adaptations pourraient induire des altérations du fonctionnement de ces mêmes systèmes. Le modèle FR50 constitue donc un terrain expérimental attrayant pour l'étude des mécanismes impliqués dans la programmation précoce de symptômes de pathologies apparentées au syndrome métabolique.

#### I.A.3. Bases physiopathologiques de la programmation

Bien que la compréhension de l'ensemble des phénomènes qui aboutit à la programmation d'un phénotype global prédisposant à l'apparition de pathologies métaboliques et cardiovasculaires reste largement incomplète, un certain nombre de mécanismes ont pu être identifiés et décrits suite à l'ensemble des observations réalisées chez l'homme et l'animal. La dénutrition et le stress périnatal semblent être les deux processus majeurs à l'origine de ces mécanismes (qui peuvent leur être spécifiques ou communs).

##### *I.A.3.1. Programmation neuroendocrinienne*

La limitation de la disponibilité des nutriments au cours du développement entraîne une série de modifications métaboliques et endocriniennes visant, en accord avec l'hypothèse du « thrifty phénotype », à adapter le rythme de développement du fœtus à la disponibilité des nutriments. Ces adaptations seraient réalisées au travers d'une économie des ressources énergétiques et d'un détournement du flux sanguin, ceci afin de préserver le développement du cerveau, et découleraient de la modification de l'activité et de la mise en place des tissus ainsi que des grands axes hormonaux et neuroendocriniens impliqués dans le contrôle du métabolisme énergétique et cardiovasculaire. A plus long terme, les modifications structurales, fonctionnelles, et épigénétiques préparant l'organisme aux futures conditions nutritionnelles présumées restreintes, pourraient alors exercer une influence d'autant plus néfaste sur la santé que les conditions nutritionnelles sont redevenues plus clémentes, voire excessives.

##### *L'axe somatotrope*

L'axe somatotrope joue un rôle primordial au cours de l'ontogenèse, via ses principaux médiateurs, l'hormone de croissance (GH) et les « Insulin-like Growth Factor » (IGF), et constitue donc une des cibles potentielles de la programmation. La GH est sécrétée par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse sous le contrôle des neuropeptides hypothalamiques, tels que l'hormone de libération de la GH (GH-RH) et la somatostatine (Pombo *et al.*, 2001). Le profil de sécrétion de la GH est dépendant du statut nutritionnel et fournit à l'organisme un message global de freinage ou d'accélération de sa croissance. De plus, il est soumis, à court et long terme, aux altérations de l'environnement précoce. Par exemple, une dénutrition protéique chez le rat entraîne une réduction des taux de GH moyens chez l'adulte (Harel and Tannenbaum, 1993; Harel and Tannenbaum, 1995). La plupart des actions anaboliques de l'axe somatotrope est exercée par l'IGF-I, qui est induit par la GH, au niveau de nombreux tissus. Cependant, il a été montré que

l'IGF-I circulant est majoritairement lié à la production hépatique chez les animaux sauvages (Le Roith *et al.*, 2001; Sjogren *et al.*, 1999). L'IGF-I est présent dans les liquides de l'organisme lié à plus de 99% à une famille de protéines de transport de l'IGF, les « IGF Binding Protein » (IGF-BP). Ces dernières contrôlent ainsi la disponibilité et la demi-vie de cette hormone et coordonnent ses effets biologiques (Hwa *et al.*, 1999). Les modèles de souris présentant une inactivation génique du gène codant l'IGF-I ont montré clairement son influence stimulatrice sur le développement de l'organisme (poids de naissance réduit de 45%), et plus spécifiquement du foie, des muscles, des os et des organes sexuels (Barker *et al.*, 1993a). De façon très intéressante, Sjogren et coll. ont pu montrer que les animaux présentant une inactivation du gène de l'IGF-I uniquement dans les hépatocytes présentent une insulino-résistance à l'âge adulte en dépit d'un poids de naissance et d'un développement comparables à ceux des animaux témoins (Sjogren *et al.*, 1999). Par conséquent, un des mécanismes par lesquels une détérioration du statut nutritionnel au cours du développement exerce des effets délétères sur l'ontogenèse des différents organes semble être lié à des modifications de l'activité et de la mise en place de l'axe somatotrope, résultant en des taux de GH, d'IGF, ou d'IGF-BP altérés. La persistance à long terme de ces altérations tissulaires et neuroendocrines pourrait alors participer à la genèse du syndrome métabolique. En effet, des études épidémiologiques ont associé des perturbations de l'axe somatotrope à une augmentation du risque de développer des maladies cardiovasculaires et métaboliques (Holt, 2002). De plus, l'administration d'IGF-I à l'âge adulte a été envisagée à des fins curatives. Dans ce sens, Vickers et coll. ont démontré que l'hypertension systolique, l'accumulation abdominale des lipides, l'hyperinsulinémie et l'hyperleptinémie développées par les rats ayant subi une restriction alimentaire de 70% au cours de la gestation sont atténuées par une infusion d'IGF-I (3µg/g/jour) durant 2 semaines à l'âge adulte (Vickers *et al.*, 2001). Par ailleurs, le rattrapage postnatal du retard de croissance induit par une dénutrition protéique au cours de la gestation, avec ses potentiels effets délétères (Hales and Ozanne, 2003), est en partie attribuable à l'IGF-I (Muaku *et al.*, 1997). Quoi qu'il en soit, compte tenu du très large spectre d'action de la GH et des IGFs ainsi que des différences entre les espèces murines et l'homme quant aux effets d'une dénutrition sur l'axe somatotrope (Thissen *et al.*, 1994), l'interprétation anthropologique de ces résultats reste très délicate et limitée.

#### *L'axe adipo-insulaire*

Le statut énergétique de l'organisme est évalué au travers des taux plasmatiques de glucides et de lipides qui vont déterminer, selon la sensibilité de l'organisme et la période du

développement envisagée, les concentrations des deux principales hormones sensibles au statut nutritionnel : la leptine et l'insuline. L'insuline est sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas en réponse à la concentration sanguine en glucose, qui connaît un pic en période postprandiale (Woods and Seeley, 2000). De façon intéressante, il a été montré que la sensibilité des cellules  $\beta$  à une stimulation par le glucose est aussi conditionnée par le statut lipidique de l'organisme et que leur réponse est proportionnelle à la masse grasseuse (Bagdade *et al.*, 1967). Le taux plasmatique d'insuline résulte donc de l'intégration par les cellules  $\beta$  des statuts glucidique et lipidique de l'organisme. La fonction la plus immédiate de l'insuline est d'induire l'entrée du glucose dans les cellules grâce à l'induction des transporteurs membranaires du glucose (GLUT). Ce captage cellulaire du glucose est particulièrement sensible à l'insuline au niveau des organes de stockage que sont le muscle, le foie et les adipocytes, qui, en reconstituant leurs réserves énergétiques, participent de façon active à la normalisation de la glycémie. L'insuline, qui peut traverser la barrière hémato-encéphalique, exerce également une influence hypothalamique inhibitrice sur le contrôle de la prise alimentaire, régulant ainsi la balance énergétique à plus long terme.

En 1994, la découverte de la leptine, sécrétée par les adipocytes, et le clonage du gène *ob* qui code cette hormone mirent fin à la vision de l'insuline en tant que signal périphérique exclusif et souverain d'adiposité (Zhang *et al.*, 1994). En effet, la leptine est non seulement retrouvée dans le plasma à des taux proportionnels à la masse adipocytaire, mais elle est également capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (Considine *et al.*, 1996; Considine, 1997; Considine and Caro, 1997). La leptine possède également une influence fondamentale sur la régulation de la prise alimentaire et le développement du système nerveux. En effet, les souris homozygotes présentant une mutation autosomique récessive du gène *ob* (souris *ob/ob*) ont un comportement alimentaire hyperphagique, ce malgré des taux d'insuline excessifs, et développent une obésité sévère (Zhang *et al.*, 1994). Ces effets délétères sur la prise alimentaire résultent d'une perte des connexions inhibitrices entre le noyau arqué<sup>18</sup> et le noyau para-ventriculaire (NPV) de l'hypothalamus, ce qui peut être prévenu par l'administration postnatale de leptine, et plus particulièrement par la restauration du pic qui a lieu au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine de vie chez la souris (Bouret *et al.*, 2004). La leptine et l'insuline constituent donc les deux principaux signaux périphériques

---

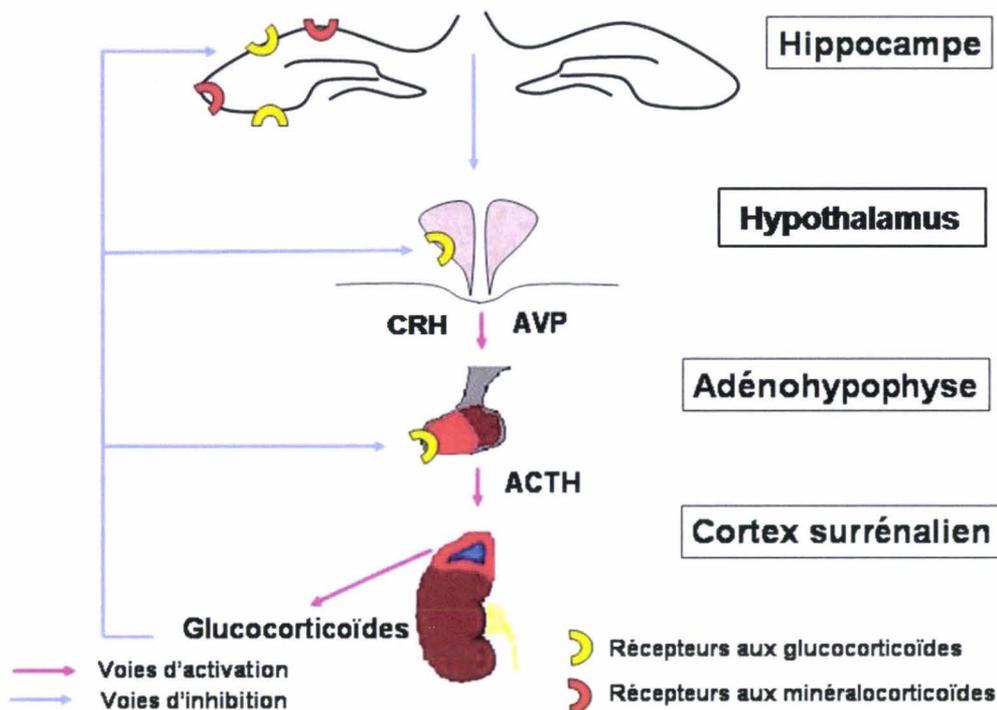
<sup>18</sup> Principal centre d'intégration et de contrôle de la prise alimentaire

renseignant le cerveau sur le statut énergétique et lipidique de l'organisme. Ainsi, une perturbation de l'environnement nutritionnel au cours de l'ontogenèse induit des modifications des taux de leptine et d'insuline. Par exemple, une restriction protéique isocalorique de 50% au cours de la gestation entraîne une augmentation de la concentration plasmatique en leptine chez le rat mâle adulte (Zambrano *et al.*, 2006). De même, une dénutrition protéique de 60% au cours de la gestation et de la lactation chez le rat mâle entraîne une hyperinsulinémie chez la descendance à l'âge de 20 semaines (Sugden and Holness, 2002). Considérant les effets pléiotropes de l'insuline et de la leptine sur l'activité de l'organisme, et plus particulièrement du foie et du tissu adipeux, une telle augmentation de leur taux plasmatique à l'âge adulte pourrait avoir des effets adverses sur le métabolisme énergétique et cardiovasculaire. De plus, ces résultats évoquent fortement la résistance à l'insuline ou à la leptine retrouvée communément chez les individus présentant un syndrome métabolique (Barker, 2007; Kyle and Pichard, 2006). Plus particulièrement, la résistance à l'insuline se développerait précocement. A ce propos, Simmons et coll. ont pu montrer une insulino-résistance au niveau du muscle après un RCIU induit par une ligature bilatérale des artères utérines au 19ème jour de gestation chez le rat (Simmons *et al.*, 1993). Cette résistance participerait à l'économie du glucose périphérique pour le fonctionnement du cerveau.

*I.A.3.2. Adaptation au stress : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et glucocorticoïdes*

*L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien*

Le fait qu'une dénutrition constitue une rupture de l'homéostasie, interprétée par l'organisme comme un stress, laissait suspecter l'implication possible du stress maternel dans la physiopathologie du RCIU et des maladies qui y sont associées. De façon générale, un stress va entraîner de nombreux ajustements hormonaux et comportementaux nécessaires au maintien de l'homéostasie face à des défis externes ou internes. Ces ajustements sont réalisés au travers de l'activation des systèmes de réponse au stress dont le principal acteur est l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) ou axe corticotrope (figure 6).



**Figure 6** : Anatomie de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien. NPV : noyau paraventriculaire ; CRH : corticotropin-releasing hormone ; AVP : arginine vasopressine ; ACTH : adrenocorticotropin hormone

Ce dernier présente une organisation caractéristique d'un système neuroendocrinien (figure 6). L'hypothalamus et ses noyaux paraventriculaires (NPV) constituent le premier centre de contrôle de l'axe HHS. L'hypothalamus intègre une multitude de signaux provenant de sources internes et externes qui vont mener à l'activation des NPV, ce qui initie la réponse de l'axe corticotrope. Ainsi, un stress induit la libération de neurohormones dans le système porte hypothalamo-hypophysaire par les neurones parvocellulaires des NPV de l'hypothalamus. Ces neurohormones, le CRH (corticotropin-releasing hormone) et l'AVP (arginine vasopressine), vont atteindre les cellules corticotropes de l'adénohypophyse et stimuler la libération d'ACTH (adrenocorticotropin hormone ou corticotropine) dans la circulation. L'ACTH plasmatique a pour organes cibles des glandes endocrines périphériques, les surrénales, et plus spécifiquement le cortex surrénalien (ou corticosurrénale) qui sécrète les glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme et corticostérone chez le rat). Les glucocorticoïdes sont le produit final de l'axe corticotrope et le cortex surrénalien constitue donc son niveau terminal. Les glucocorticoïdes sont responsables des effets physiologiques caractéristiques de l'activation de l'axe et interviennent dans la régulation de nombreux processus physiologiques comme l'induction de la synthèse du glucose

(néoglucogénèse hépatique), la maturation des poumons, la synthèse de l'adrénaline (A) par la glande médullosurrénale, ou encore l'inhibition de la réponse inflammatoire (Barnes and Adcock, 1993). Par ailleurs, ils jouent également un rôle clef dans le contrôle de l'activité basale de l'axe ainsi que dans la terminaison de la réponse au stress. Cette terminaison fait intervenir un mécanisme de rétrocontrôle négatif par les glucocorticoïdes à tous les niveaux de l'axe HHS, tels que l'hypothalamus et l'hypophyse, mais aussi sur des centres régulateurs extra-hypothalamiques tels que l'hippocampe (figure 6). La majorité des effets périphériques des glucocorticoïdes est médiée par les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) exprimés au niveau des tissus cibles. Par ailleurs, l'activation croisée par les glucocorticoïdes des récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR), qui avaient jusqu'alors principalement été décrits dans des structures centrales, telles que de l'hippocampe, confère aux glucocorticoïdes une influence sur le comportement, l'apprentissage et la mémoire (McEwen and Sapolsky, 1995), et intervient également dans le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur l'axe corticotrope via l'hippocampe. Quoi qu'il en soit, des travaux réalisés au laboratoire permettent de suspecter un rôle des MR dans les effets périphériques des glucocorticoïdes, puisque ceux-ci semblent en réalité présenter une distribution aussi large que les GR (Dutriez-Casteloot *et al.*, 2007).

Bien que les glucocorticoïdes soient capables de traverser la barrière placentaire, de nombreux tissus périphériques expriment un système enzymatique d'activation et d'inactivation des glucocorticoïdes, les 11 $\beta$ -hydroxy-stéroïdes déshydrogénase (11 $\beta$ -HSD) 1 et 2. Au niveau placentaire, ce système est sensé protéger le fœtus contre des variations transitoires des taux plasmatiques maternels. En effet, la 11 $\beta$ -HSD1, qui présente elle aussi une vaste distribution dans l'organisme, est une enzyme capable de convertir des résidus inactifs comme la cortisone et la 11-déhydrocorticostérone en glucocorticoïdes actifs, potentialisant ainsi les effets biologiques de ces hormones. A l'inverse, la 11 $\beta$ -HSD2, qui présente une distribution plus restreinte va cataboliser les glucocorticoïdes en 11-déhydrocorticostérone, qui présente une plus faible affinité pour les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR et MR), et va donc minimiser leurs effets biologiques.

#### *Glucocorticoïdes et programmation*

Au sein des mammifères, une dénutrition maternelle correspond à un stress nutritionnel qui va entraîner une activation de l'axe corticotrope aboutissant à une augmentation des taux de glucocorticoïdes maternels (Vieau *et al.*, 2007). Les données montrant que l'administration exogène de glucocorticoïdes au cours de la gestation ainsi que la présence d'une mutation de la 11 $\beta$ -HSD2 chez la mère, qui va entraîner une surexposition du fœtus aux glucocorticoïdes,

suffisent à réduire le poids de naissance (Vieau *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2006; Seckl and Holmes, 2007) abondent dans le sens d'un rôle fondamental des glucocorticoïdes dans la genèse du RCIU. Leur influence au cours de l'ontogenèse du fœtus pourrait donc être double et s'exercer, d'une part, au niveau du placenta et, d'autre part, via la régulation du développement de l'axe HHS et des organes du fœtus par les glucocorticoïdes maternels (Vieau *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2006; Phillips, 2007).

Bien que l'intérêt porté à l'implication possible des altérations du placenta dans la programmation précoce des pathologies chroniques ne soit que très récent, la présence de récepteurs GR et MR suggère l'existence d'une influence directe des glucocorticoïdes sur sa croissance et/ou ses fonctions. En effet, des altérations de la masse du placenta ainsi que de l'expression de certains facteurs de croissance et des 11 $\beta$ -HSD ont été décrites dans différentes études (Jansson and Powell, 2007; Seckl and Holmes, 2007). De plus, les glucocorticoïdes maternels, tout comme l'hypoxie ont un effet direct sur les échanges fœto-placentaires en provoquant une redistribution de l'afflux sanguin vers le cerveau (Rudolph, 1984). Ainsi les modifications de l'axe corticotrope pourraient participer aux altérations du placenta observées suite à une dénutrition prénatale. Quoi qu'il en soit, la physiologie des échanges placentaire est infiniment complexe ; de même, l'influence des glucocorticoïdes sur la physiologie du placenta et celle du placenta sur le métabolisme des glucocorticoïdes restent actuellement très mal connues.

Au cours de la période fœtale, l'axe HHS se met en place dans un environnement baigné par les hormones maternelles dont les glucocorticoïdes. Leur présence en concentration conséquente d'un point de vue physiologique joue un rôle dans le développement des différents acteurs de l'axe corticotrope du fœtus tout en maintenant celui-ci dans un état de quasi quiescence. Malgré la présence de la 11 $\beta$ -HSD2 au niveau placentaire, un certain nombre de données obtenues chez l'homme comme chez l'animal indique qu'une activation prolongée de l'axe corticotrope de la mère, découlant ou non d'une dénutrition, mène à une surexposition du fœtus aux glucocorticoïdes maternels (Jansson and Powell, 2007; Lesage *et al.*, 2006). Ils viendraient alors perturber la mise en place et l'activité de l'axe HHS en développement. Chez l'homme comme chez l'animal, un grand nombre d'études réalisées en période postnatale ainsi que chez l'adulte corrobore cette vision en décrivant des perturbations de l'activité de l'axe HHS à ses différents

niveaux suite à une dénutrition au cours du développement périnatal<sup>19</sup> (Lesage *et al.*, 2006; Seckl and Holmes, 2007). Plus particulièrement, les auteurs s'accordent sur l'augmentation récurrente des taux de glucocorticoïdes. De telles modifications étant également retrouvées suite à une administration exogène de glucocorticoïdes au cours du développement<sup>20</sup>, ces derniers semblent donc jouer un rôle prépondérant dans les altérations de l'axe corticotrope induites par une dénutrition maternelle chez la descendance.

En considérant l'influence des glucocorticoïdes sur le développement et l'activité de tissus tels que le foie, les vaisseaux sanguins, le pancréas ou encore le tissu adipeux, une augmentation chronique de l'activité de l'axe corticotrope pourrait potentiellement être impliquée dans la genèse des pathologies apparentées au syndrome métabolique (Vieau *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2006; Seckl and Holmes, 2007; Walker, 2006). De plus, les données provenant d'individus présentant une hypercortisolémie induite par une tumeur corticotrope hypophysaire, ou maladie de Cushing, abondent dans ce sens, puisque les patients développent systématiquement une obésité sévère et avec une très forte prévalence des pathologies telles que le diabète ou l'hypertension (Magiakou *et al.*, 2006; Magiakou and Chrousos, 1994; Morris and Grossman, 2002). Ainsi, l'influence de l'activité de l'axe corticotrope sur la programmation des pathologies métaboliques et cardiovasculaires semble pouvoir s'exercer à la fois au cours de la période périnatale, en favorisant un RCIU, mais également chez l'organisme mature, en entraînant des modifications homéostatiques délétères. Une polémique a cependant été levée suite à des études rapportant que les altérations précoces et tardives notées dans les modèles « dexaméthasone » étaient partiellement imputables à la réduction de la prise alimentaire maternelle engendrée par les glucocorticoïdes, complexifiant ainsi la question du rôle des glucocorticoïdes dans la programmation (Woods, 2006; Woods and Weeks, 2005).

#### *Exemple des animaux FR50*

Comme nous l'avons précédemment évoqué, un grand nombre d'études réalisées ces quinze dernières années établit une implication directe de l'axe corticotrope dans la genèse du RCIU et du syndrome métabolique (Vieau *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2006; Seckl and Holmes,

---

<sup>19</sup> Une description plus détaillée sera donnée dans le chapitre concernant le modèle développé au laboratoire (FR50).

<sup>20</sup> en médecine périnatale ainsi que dans des modèles utilisant des injections de dexaméthasone.

2007). Cette influence sur l'homéostasie de l'organisme est d'autant plus marquée qu'elle est conservée chez l'homme comme chez différents mammifères. De plus, la simple injection de glucocorticoïdes au cours du développement précoce suffit à reproduire un RCIU ainsi que certaines pathologies associées (Seckl, 2001). Il était donc nécessaire de caractériser les effets de la dénutrition maternelle sur la mise en place et l'activité de l'axe HHS chez les animaux FR50 et leur répercussion à long terme (tableau 2). Afin de s'affranchir des différences de réactivité entre les animaux des deux sexes face aux modifications de l'environnement précoce ainsi que dans les taux d'hormones sexuelles liées au cycle oestrien, nous décrivons uniquement les altérations rapportées chez les mâles.

	E21	P21	4 mois	8 mois
<b>Morphologie</b>				
Poids corporel	↓	↓	↓	↓
Masse relative des surrénales	↓	↑	↑	↑
<b>Hippocampe</b>				
ARNm MR	↓	↑	↑	↑
ARNm GR	↓	↑	↓	↓↓
<b>Hypothalamus</b>				
ARNm CRH	↓	↔	↔	↔
ARNm AVP	nd	nd	↔	↑
<b>Adénohypophyse</b>				
ARNm POMC	↔	↔	↑	↑
<b>Plasma</b>				
ACTH	↓↓	↓	↔	↔
CGB	↔	↓	↔	↔
Corticostérone	↓	↔	↔	↑↑
Corticostérone libre	↓	↑	↔	↑↑
	Lesage et al., 2001	Leonhardt et al., 2002	Sebaani et al., 2002	Sebaani et al., 2004

Tiré de Lesage et al., 2006, *Stress*, Vol 9, 4:183-198

**Tableau 2 :** Altérations de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien chez les animaux FR50 mâles au cours de la vie. ↓ : réduction ; ↑ : augmentation ; ↔ : pas de modification ; nd : non déterminé.

Au cours de la dernière semaine de gestation, le régime FR50 induit une activation de l'axe HHS maternel résultant en des taux circulants de glucocorticoïdes accrus dès E19 et, à terme, en une augmentation du poids relatif des glandes surrénales (Lesage et al., 2001). Cette réponse maternelle à la dénutrition s'accompagne de plus d'une réduction de la protéine de transport des glucocorticoïdes (CBG) plasmatique, ce qui laisse supposer que la quantité de corticostérone libre est fortement augmentée au cours des grossesses FR50. De plus, la diminution de l'expression

placentaire de la 11 $\beta$ -HSD2, qui inactive les glucocorticoïdes maternels, suggère que les fœtus FR50 sont soumis à une surexposition aux glucocorticoïdes au cours des 3 derniers jours de la gestation. A la naissance, les animaux FR50 présentent une réduction du poids des surrénales et du taux d'ACTH plasmatique (Lesage *et al.*, 2001). Ces altérations de l'axe corticotrope semblent être spécifiquement liées à la surexposition du fœtus aux glucocorticoïdes maternels, comme le montre leur abolition chez les mères FR50 surrénalectomisées (Lesage *et al.*, 2001). Ainsi, le régime FR50 induit une surexposition du fœtus aux glucocorticoïdes maternels qui perturbe la mise en place de l'axe corticotrope.

Au sevrage, la dénutrition maternelle périnatale entraîne une diminution du poids absolu des glandes surrénales tandis que leur masse relative est augmentée (Leonhardt *et al.*, 2002). Bien que les taux plasmatiques de corticostérone ne soient pas modifiés, la réduction de la concentration sanguine en CBG suggère une élévation des taux de corticostérone libre à ce stade. Au regard de la réduction de la réponse plasmatique de l'ACTH ainsi que du retour de la corticostéronémie en dessous du niveau basal suite à un stress par inhalation d'éther et de la surexpression des MR dans les cornes d'Ammon (CA) 1 et 3 de l'hippocampe (Leonhardt *et al.*, 2002), ces résultats semblent indiquer que la dénutrition maternelle périnatale résulte en une augmentation du rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur l'axe corticotrope au sevrage.

Bien que le poids absolu des glandes surrénales et le niveau d'expression de la CBG soient toujours réduits chez les animaux FR50 adultes âgés de 4 mois (Lesage *et al.*, 2002), la capacité de liaison de la CBG ainsi que les taux de corticostérone (libre et liée) et d'ACTH plasmatique ne sont pas modifiés par la dénutrition maternelle (Sebaai *et al.*, 2002b). Bien que les animaux FR50 âgés de 4 mois répondent correctement à une déshydratation de 72 heures en ce qui concerne les taux de corticostérone, les changements observés chez les animaux témoins dans la transcription des différents acteurs de l'axe en réponse à la déshydratation sont en majorité absents chez les animaux issus de mères dénutries (Sebaai *et al.*, 2002a). De plus, la dénutrition maternelle abolit l'augmentation de l'ACTH plasmatique en réponse au stress. Ainsi, alors que les altérations précoces de l'activité basale de l'axe corticotrope semblent se stabiliser chez les animaux FR50 adultes âgés de 4 mois, l'intégrité de la réponse au stress n'est cependant pas entièrement rétablie.

A 8 mois, la dénutrition maternelle périnatale entraîne une très forte augmentation de la corticostéronémie en conditions basales indépendamment d'un taux plasmatique d'ACTH normal, et ce, malgré la surexpression de l'AVP au niveau du NPV et du NSO (Sebaai *et al.*, 2004). Par

ailleurs, les effets délétères du régime FR50 sur l'activité de l'axe corticotrope en réponse à un stress sont très fortement marqués chez les animaux vieillissants (Sebaai *et al.*, 2004). En effet, les cellules du cortex surrénalien semblent être insensibles à l'augmentation de l'ACTH plasmatique induite par une déshydratation chez les animaux FR50, comme en témoigne l'absence totale d'élévation de la corticostéronémie dans ces conditions. Ceci pourrait résulter d'un découplage partiel entre l'activité du cortex surrénalien, soumise notamment aux catécholamines (Bornstein and Vaudry, 1998; Vaudry *et al.*, 2000b), et son contrôle hypothalamo-hypophysaire menant à l'augmentation des taux de glucocorticoïdes au repos. La dénutrition maternelle périnatale induit donc, à long terme, une hyperactivité de l'axe corticotrope en conditions basales ainsi qu'une perte de la réponse au stress. La glande surrénale de animaux FR50, qui est baignée de glucocorticoïdes, ne serait donc plus capable de faire face et aux stimulations de l'environnement, et, ainsi, ne remplirait plus ses fonctions d'adaptation ou « coping ». Au regard des multiples fonctions des glucocorticoïdes au sein de l'organisme, ces altérations pourraient participer à la programmation des troubles métaboliques et cardiovasculaires observés chez les animaux FR50 et évoqués précédemment.

#### *I.A.3.3. Programmation précoce et modifications épigénétiques*

Bien qu'un grand nombre d'études réalisées au cours de ces quinze dernières années ait contribué à éclairer la compréhension des adaptations neuroendocrines liées à la programmation, les mécanismes moléculaires à l'origine de telles adaptations sont encore largement méconnus. Comme il a été souligné précédemment, les premières études portant sur l'influence des génomes maternel et paternel sur le RCIU ont conclu que ces derniers n'incombaient respectivement que pour 20% et 18% dans les variations du poids de naissance (Robert and Bear, 1997). Ainsi, l'existence d'autres influences régulatrices de l'expression génétiques des différents acteurs de la programmation fut suspectée. L'avancée considérable dans les travaux portant sur l'implication des altérations épigénétiques dans la cancérisation a permis un meilleur déchiffrement du « code épigénétique » ainsi que l'identification de certains de ses acteurs moléculaires et de leurs interactions. Ainsi, au confluent des théories du « thrifty génotype » et du « thrifty phénotype », la notion de « programmation épigénétique » commence à émerger (Junien *et al.*, 2005). En effet, la modulation, par l'environnement périnatal, de l'expression d'un certain nombre de gènes clés au cours du développement pourrait être en partie accomplie au travers de l'altération de l'occurrence des modifications épigénétiques. D'une part, celles-ci consistent en des modifications post-traductionnelles des histones, parmi lesquelles on compte l'acétylation, la méthylation,

phosphorylation et l'ubiquitination, qui vont moduler la condensation de la chromatine, et l'exposition des promoteurs qui en dépend. D'autre part, les modifications épigénétiques peuvent intervenir directement sur l'ADN par la méthylation des doublets CpG présents au sein des promoteurs, ce qui va restreindre l'accès des facteurs de transcription à leur séquence consensus, et par là même réduire la transcription.

Un nombre croissant d'études tend à confirmer l'hypothèse de « programmation épigénétique » (Junien *et al.*, 2005; Junien, 2006). Par exemple, chez le rat, les modifications de l'expression des GR induites dans l'hypocampe par un comportement maternel attentionné semblent découler de variations du degré de méthylation de leur promoteur, ainsi que d'acétylation des histones (Weaver *et al.*, 2004). De la même façon, Bogdarina et coll. ont pu montrer la présence d'une hypométhylation du promoteur du récepteur AT1b de l'angiotensine entraînant sa surexpression suite à une dénutrition protéique, ce qui participerait au développement d'une hypertension artérielle (Bogdarina *et al.*, 2007). De plus, les auteurs suggèrent que les modifications de l'expression génique chez les animaux adultes découleraient partiellement de ces altérations épigénétiques précoces, qui pourraient donc être conservées à long terme. Dans ce sens, Burdge et coll. ont mis en évidence la transmission d'une hypométhylation des récepteurs hépatiques PPARalpha et GR de la génération F1 à F2 chez des rats dont la mère (F0) a subi une dénutrition protéique de 50% durant la gestation (Burdge *et al.*, 2007). Ce phénomène pourrait représenter un des mécanismes par lesquels un phénotype induit (et non déterminé) peut se transmettre à la descendance, comme il a été observé dans des modèles de malnutrition calorique (restriction et diabète gestationnel) et protéique (Reusens and Remacle, 2006). De plus, il contribuerait à expliquer en partie le fait que le syndrome métabolique tend à apparaître de plus en plus tôt au cours de l'enfance, à être de plus en plus sévère, et à présenter un profil transgénérationnel (Junien *et al.*, 2005).

En conclusion, la modulation de l'expression de gènes, qui est nécessaire à la mise en place des adaptations métaboliques, cardiovasculaires, et neuroendocrines entraînées par une perturbation de l'environnement précoce, semble être en partie sous-tendue par des modifications épigénétiques (Sinclair *et al.*, 2007). En accord avec la théorie de Barker, ces adaptations participeraient à réinitialiser l'activité basale et la réactivité des différents axes neuroendocriniens à un niveau « adapté » aux conditions développementales (figure 7). De la persistance de cette « empreinte épigénétique » ainsi que des altérations tissulaires et neuroendocrines précoces découlerait alors une « mésadaptation » de l'organisme à un environnement devenu plus, voire

trop, favorable. Ceci provoquerait un épuisement accéléré des grands axes de régulation de l'homéostasie qui conduirait à une augmentation de la prévalence des pathologies métaboliques et cardiovasculaires chroniques de l'adulte liées, directement ou indirectement, au fonctionnement de ces axes.

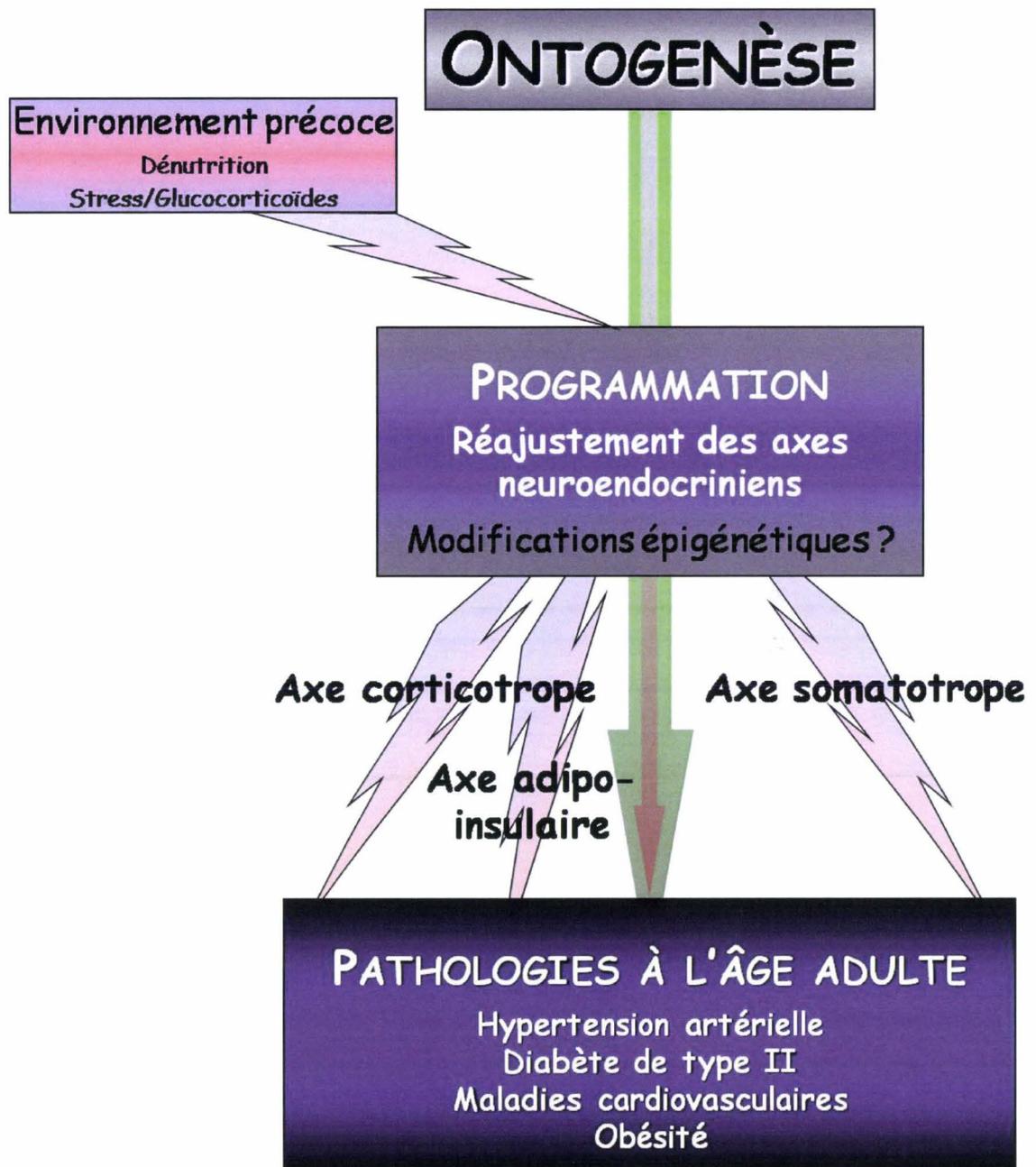


Figure 7 : Mécanismes possibles de programmation précoce de pathologies à l'âge adulte

**I.B. Adaptation au stress et programmation de l'activité de la glande surrénale :**  
**quid du système sympathosurrénalien ?**

Parmi l'ensemble des altérations décrites dans la littérature, et notamment chez les animaux FR50, il est intéressant de noter des modifications à long terme de la masse et de l'expression génique des glandes surrénales, ainsi que la programmation de modifications de l'activité des cellules stéroïdogènes du cortex. Ces adaptations structurales et fonctionnelles pourraient s'expliquer, entre autre, par un retard dans la mise en place de l'axe corticotrope et/ou par une perturbation de l'ontogenèse surrénalienne. La glande surrénale participe au maintien de l'homéostasie puisqu'elle est profondément impliquée dans les manifestations physiologiques accompagnant divers types de stress, dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral, de la tension artérielle et du métabolisme énergétique. Plus qu'une cible, la surrénale constitue ainsi un des maillons essentiels dans les mécanismes de la programmation.

#### I.B.1. La glande surrénale

Thomas Addison fut le premier à décrire, en 1855, le rôle essentiel des glandes surrénales pour la survie chez l'homme, rôle qui fut confirmé un an plus tard chez l'animal grâce aux travaux de surrénalectomie réalisés par Brown-Séguard.

La glande surrénale, située au dessus du rein (figure 8), est entourée d'une capsule conjonctive rigide renfermant deux tissus distincts, le cortex et la médulla (figure 9), qui diffèrent à la fois par leur origine embryonnaire et leur fonctionnalité. En effet, le cortex surrénalien (ou corticosurrénale), localisé à la périphérie de la glande, provient de l'épithélium cœlomique qui est lui-même issu du mésoderme, et synthétise les hormones stéroïdes. Plus précisément, de l'extérieur vers l'intérieur, on distingue : la zone glomérulée qui synthétise les minéralocorticoïdes (aldostérone), la zone fasciculée qui synthétise les glucocorticoïdes, effecteurs de l'axe HHS, et la zone réticulée qui synthétise les androgènes et ainsi que les glucocorticoïdes (figure 9).

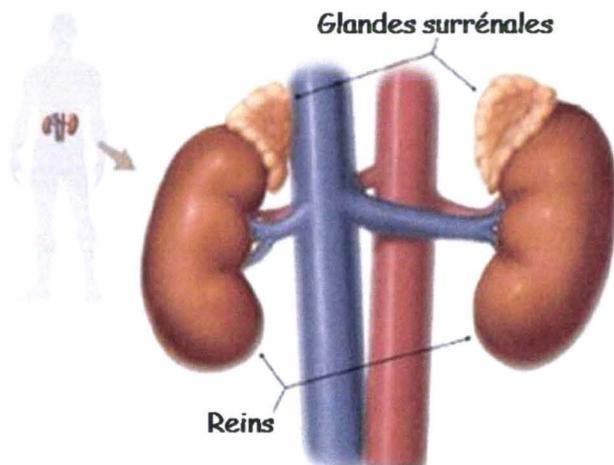
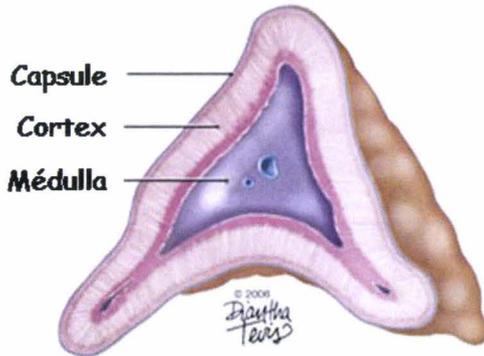
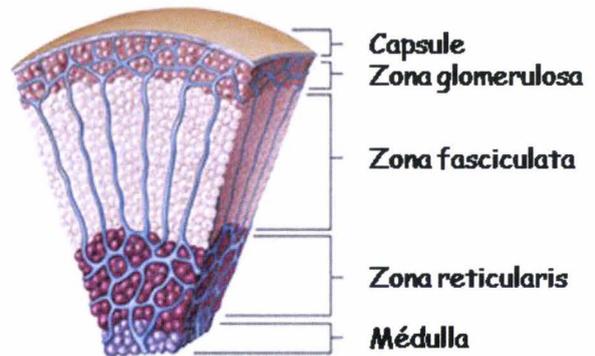


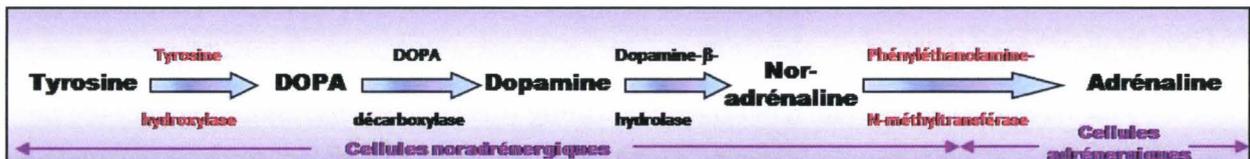
Figure 8 : Localisation des glandes surrénales

Tiré du site du Dr. Khalid Dembri ([http://www.dembri-endocrino.com/medecine.php?menu=Glande\\_surrenale.php](http://www.dembri-endocrino.com/medecine.php?menu=Glande_surrenale.php))

La médulla surrénalienne (ou médullosurrénale), située au centre de la glande (figure 9), est issue quant à elle de la crête neurale et est formée à 80% de cellules chromaffines (CC) qui synthétisent les catécholamines ainsi que de nombreux neuropeptides. Bien que l'embryogenèse de la médullosurrénale soit détaillée ci-dessous, il est nécessaire de préciser quelques points à ce stade. Les CC qui constituent la majorité de la médulla, proviennent de précurseurs de la lignée SSR, qui acquièrent un phénotype catécholaminergique spécifique au cours du développement, et représentent l'effecteur endocrinien et terminal du système SSR via la libération des catécholamines dans le sang. A maturité, la différenciation des CC aboutit à une large prédominance des CC A (qui expriment la PNMT), qui représentent environ 80% des CC de la médulla, les CC NA (qui n'expriment que la TH) ne représentant qu'environ 20 % (figure 10). La présence de neurones sympathiques intra-médullaires a également été notée, et il semblerait même que ces neurones puissent former des connections ayant titre de plexus nerveux intra-médullaire. Quoi qu'il en soit, l'activité des CC de la médulla semble répondre à la fois aux affluences sympathiques, majoritairement via le nerf grand splanchnique, mais également à des facteurs autocrines, paracrines et endocrines.

**A** Section transverse**B** Vue microscopique

**Figure 9** : Structure anatomique des glandes surrénales. A : sur une section transverse, on distingue trois tissus, de l'extérieur vers l'intérieur : la capsule, le cortex, et la médulla. Les trois zones du cortex sont très nettement observées au microscope après coloration : dans le sens centripète, la zone glomérulée ou zona glomerulosa, la zone fasciculée ou zona fasciculata, et la zone réticulée ou zona reticulata



**Figure 10** : Synthèse des catécholamines

La glande surrénale étant située dans la partie haute de l'abdomen, l'apport sanguin provient de l'artère mésentérique supérieure. La vascularisation de la glande est réalisée par un réseau dense de capillaires sinusoides qui pénètrent dans la capsule et que certains considèrent d'ailleurs comme un système porte centripète. Les cellules de la médulla seraient donc baignées par du sang veineux chargé des hormones du cortex, dont les glucocorticoïdes, qui exercent des fonctions majeures que nous exposerons par la suite. Parallèlement, la médullosurrénale reçoit du sang artériel par deux sources : principalement d'une artériole qui pénètre directement par le hile, et accessoirement par d'autres artérioles, perforant la capsule, qui gagnent le centre de la glande sans émettre de collatérales. Le sang, est ensuite recueilli par la veine surrénalienne qui quitte l'organe par le hile et rejoint la circulation générale par la veine mésentérique, où les corticostéroïdes et les catécholamines vont pouvoir aller exercer leurs effets.

**I.B.2. Pathologies surrénaliennes et syndrome métabolique**

Comme l'illustrent parfaitement les données tirées de pathologies surrénaliennes, une hyperactivité sécrétrice de la glande surrénale entraîne l'apparition de pathologies apparentées au syndrome métabolique.

*I.B.2.1. Syndrome de Cushing et glucocorticoïdes*

Selon la direction générale de la santé et l'INSERM<sup>21</sup>, le syndrome de Cushing correspond à l'ensemble des manifestations cliniques secondaires à un hypercortisolisme chronique d'origine endogène (excès de cortisol d'origine surrénalienne) ou exogène (iatrogène). L'hypocortisolisme endogène peut être dû 1) soit à une hypersécrétion d'ACTH, par un adénome hypophysaire (maladie de Cushing) ou par une autre tumeur (non-hypophysaire) responsable d'une sécrétion ectopique d'ACTH (syndrome de Cushing paranéoplasique); 2) soit à une hypersécrétion de cortisol par une tumeur de la surrénale, bénigne (adénome) ou maligne (corticosurréalome). Dans tous les cas, le syndrome de Cushing se manifeste par divers troubles physiologiques, parmi lesquels il est important de noter une obésité du tronc et du visage, une hypertension artérielle et un diabète de type II (Magiakou *et al.*, 2006; Magiakou and Chrousos, 1994; Morris and Grossman, 2002).

La symptomatologie du syndrome de Cushing (obésité, hypertension, diabète) laissait donc fortement présumer l'influence possible des glucocorticoïdes et de l'activité de l'axe HHS dans la programmation de pathologies apparentées au syndrome métabolique. Au regard des données de la littérature précédemment exposées, les conditions de stress découlant des modifications de l'environnement périnatale exerceraient donc leurs effets pathogènes en partie via la programmation à long terme de l'activité du cortex surrénalien de l'organisme en développement (Vieau *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2006; Seckl and Holmes, 2007; Walker, 2006). Ainsi, la corticosurrénale, cible de la programmation, organe effecteur de l'axe HHS, et cause étiologique de pathologies apparentées au syndrome métabolique, représente un lien central entre environnement précoce et pathologies tardives.

---

<sup>21</sup> Site éditeur : [Orphanet](http://www.orpha.net), base de données sur les maladies rares et les médicaments orphelins ([http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=FR&Expert=553](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=553))

*I.B.2.2. Phéochromocytomes et catécholamines*

Sur le plan pathologique, les phéochromocytomes, à l'instar du syndrome de Cushing pour l'axe HHS, constituent un bon modèle des effets d'une surproduction de catécholamines et d'une suractivation du système SSR. Toujours selon la direction générale de la santé et l'INSERM, les tumeurs sécrétant des catécholamines peuvent se développer au niveau de la médullosurrénale (phéochromocytomes) ou à partir des cellules chromaffines extra-surréaliennes (paragangliomes sécrétants). Les phéochromocytomes sont la plupart du temps associés à la présence de symptômes sympathiques (céphalée, tachycardie, sueurs) et de signes, parmi lesquels figurent principalement l'hypertension, la perte de poids et le diabète de type II (Kearney and Dang, 2007; Takekoshi, 2005; Widimsky, Jr. *et al.*, 2007; Zelinka *et al.*, 2007). De plus, les tumeurs sécrétant des catécholamines génèrent un tableau clinique imitant les états paroxysmaux accompagnés d'hypertension et/ou de troubles du rythme cardiaque, comme les attaques de panique, dans lesquelles l'activation du système SSR liée à l'anxiété produit ces mêmes signes et symptômes (Goldstein *et al.*, 2002; Zaubler and Katon, 1996).

Ainsi, le fait que les patients présentant une hyperactivité de la glande médullosurrénale, ainsi qu'une hypersécrétion des catécholamines, développent également des pathologies cardiovasculaires et métaboliques pose la question de l'influence possible de modifications de la composante endocrine du système SSR dans la programmation de pathologies apparentées au syndrome métabolique. Cependant, dans la majorité des modèles expérimentaux, l'attention s'est principalement portée sur les altérations du cortex surrénalien, et plus particulièrement de l'activité des cellules de la zone fasciculée qui, produisant les glucocorticoïdes, constituent le niveau terminal de l'axe HHS. Par conséquent, et bien que la glande médullosurrénale et le système sympathosurrénalien (SSR) constituent, au même titre que la corticosurrénale et l'axe corticotrope, un axe neuroendocrinien majeur de la réponse au stress, les effets possibles d'un environnement périnatal délétère sur leur activité ont jusqu'alors été peu étudiés.

#### I.B.3. Système sympathosurrénalien et programmation fœtale

Cependant, au cours de ces dernières années, plusieurs équipes ont progressivement focalisé leurs recherches sur l'appartenance possible du système SSR aux mécanismes impliqués dans la programmation, mettant en évidence des adaptations de sa mise en place et de son activité à long terme, suite à des modifications de l'environnement précoce.

##### *I.B.3.1. Données épidémiologiques*

De récentes publications font effectivement état d'altérations de l'activité du système SSR chez différentes populations d'enfants présentant un faible poids de naissance (Phillips *et al.*, 2006; Phillips and Jones, 2006). Des différences entre les deux sexes ont été mises en évidence au Royaume Uni grâce aux données collectées chez 68 garçons et 72 filles pré-pubères (7-9 ans) nés à Southampton (Jones and Judd, 2006; Phillips and Jones, 2006). Dans cette population, les enfants de sexe féminin présentent une activation augmentée du SNS cardiaque à la fois au repos et en réponse au stress, comme en témoigne les modifications de l'intervalle QT<sup>24</sup> et de la période de pré-éjection cardiaque. A l'inverse, le SNS cardiaque des individus masculins ne semble pas être affecté. Dans une étude portant sur 62 enfants âgés de 8-10 ans et nés à l'hôpital de Kingston en Jamaïque, Fernald et coll. ont pu montrer une hausse de l'excrétion urinaire des catécholamines en réponse à un stress psychologique suite à un retard de croissance chez les enfants des 2 sexes (Fernald and Grantham-McGregor, 2002). Les auteurs associent ces résultats aux modifications observées dans différents tests psychologiques chez ces mêmes enfants (Fernald and Grantham-McGregor, 1998), suggérant que des altérations de la réponse au stress, et en particulier de l'activité du système SSR, pourraient exercer des effets néfastes sur le développement psychologique. Par ailleurs, Johansson et coll. viennent tout juste de rapporter une augmentation des catécholamines urinaires ainsi que du rythme cardiaque en conditions basales et en réponse à un stress mental, indépendamment de la pression artérielle, chez 105 enfants (âgés de 9 à 10 ans) des deux sexes nés dans les hôpitaux de Stockholm en Suède (Johansson *et al.*, 2007). De plus, il

---

<sup>24</sup> Cet intervalle correspond au temps de systole ventriculaire, qui va du début de l'excitation des ventricules jusqu'à la fin de leur relaxation

semblerait que cet accroissement de la réponse du rythme cardiaque soit corrélé à celui des taux de catécholamines. Les auteurs concluent donc qu'un faible poids de naissance conduit à une hyperactivité du système SSR dans l'enfance, comprenant un contrôle cardiovasculaire altéré, ce qui pourrait participer à l'accroissement des risques de développer une hypertension à l'âge adulte.

A l'âge adulte, un nombre croissant de résultats confirme l'existence d'altérations tardives de l'activité du système SSR, auxquelles les femmes semblent être plus sensibles, suite à un retard de croissance précoce (Phillips, 2007). Une étude réalisée sur 104 hommes et 79 femmes âgés de 26 ans extraits de l'« Adelaide Children's Hospital Family Heart Study Cohort », a permis de démontrer pour la première fois une programmation de la réponse du système SSR à un stress psychologique<sup>25</sup> (Ward *et al.*, 2004). Chez les femmes, les auteurs décrivent une augmentation de la pression artérielle et du rythme cardiaque en réponse au stress, qui n'est pas retrouvée chez les hommes. L'intégration statistique de ces paramètres suggère une modulation des fonctions sympathiques et parasympathiques contrôlant le baroréflexe cardiaque. Parallèlement, les données collectées par Jones et coll. au cours de l'analyse prospective d'une cohorte d'individus réalisée en Australie montrent des différences dans le fonctionnement du système nerveux autonome et du baroréflexe chez les femmes, ce qui résulte en une augmentation de la réponse cardiaque à un stress (Jones *et al.*, 2007). Ainsi, les signes d'une croissance fœtale altérée sont associés à des modulations du contrôle cardiaque par les systèmes sympathique et parasympathique, mais de façon spécifique au genre de l'individu. A l'inverse, l'analyse spectrale de la variabilité du rythme cardiaque réalisée sur 137 hommes et femmes âgés de 20 ans et sélectionnés dans la cohorte de jeunes adultes « Adelaide Children's Hospital Family Heart Study », a permis de montrer des modifications de l'activité autonome chez les individus des deux sexes (Flanagan *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2007). De la même façon, McMillen et coll. citent une étude réalisée sur 449 hommes nés à Preston, UK, qui montre une réduction du rythme cardiaque de 2,7 battements par minute par kilo de poids de naissance au dessus de 2,5kg (McMillen *et al.*, 2001). Ces effets semblent être indépendants de l'IMC et du rapport taille/hanche ainsi que d'autres facteurs tels que la classe sociale ou la consommation d'alcool et de tabac. Ainsi, bien que le rythme cardiaque soit un critère imparfait d'évaluation de l'activité sympathique, ces résultats sont en accord avec l'hypothèse qu'une augmentation de l'activité SNS établie *in utero* est un des mécanismes reliant

---

<sup>25</sup> Le Trier Social Stress Test est un test psychologique qui implique, entre autre, l'emploi d'un stress psychosocial (tâche d'expression publique).

un faible poids de naissance à des effets adverses tels qu'une hypertension artérielle ou une insulino-résistance (McMillen *et al.*, 2001). Les nombreuses études réalisées sur les individus nés au cours de la famine d'Amsterdam semblent corroborer la modulation des fonctions du système SSR dans une population exposée à une dénutrition prénatale (de Rooij *et al.*, 2006a; de Rooij *et al.*, 2006c; McMillen *et al.*, 2001; Painter *et al.*, 2006). En globalité, tandis que la spécificité des altérations du système SSR aux individus de l'un des deux sexes reste discutable, les études s'accordent cependant sur des répercussions à long terme de l'environnement précoce sur l'activité de ce système. De telles modifications de la réponse du système SSR au stress pourraient alors participer à l'étiologie des pathologies associées au syndrome métabolique (Phillips *et al.*, 2006).

#### *I.B.3.2. Données expérimentales*

Parallèlement à l'émergence des études épidémiologiques incriminant le système SSR comme cible et acteur potentiels de la programmation de pathologies métaboliques et cardiovasculaires, de nombreuses équipes se sont penchées sur de telles modifications dans les modèles animaux de programmation (Young, 2002; Young, 2006; Young and Morrison, 1998).

#### *Le système nerveux sympathique*

Une grande partie des travaux réalisés chez l'animal a porté sur les adaptations du SNS suite à des modifications des conditions environnementales précoces, telles que la température d'élevage, la nutrition maternelle, ou encore la manipulation des nouveau-nés (Tableau 3) (Young, 2006). Comme la NA constitue le principal neurotransmetteur du SNS, sa concentration tissulaire au repos est un indicateur de l'intensité de l'innervation sympathique (densité et fréquence des influx dans les terminaisons nerveuses). Ainsi, il a tout d'abord été observé que chez les animaux obèses ou hypertendus, la concentration en NA au niveau de différents tissus est fréquemment altérée (Young and Morrison, 1998). Par exemple, des rats spontanément hypertendus présentent une augmentation des niveaux de NA dans le rein et les vaisseaux (Head, 1989; Kawamura *et al.*, 1991). Ainsi, des modulations de l'innervation sympathique semblent être retrouvées dans des modèles de pathologies métaboliques et cardiovasculaires dont l'étiologie n'est pas liée à la programmation, ce qui suggère une implication des altérations du SNS dans la genèse de ces maladies.

L'équipe de Young a fortement contribué à la compréhension de la plasticité du SNS en se penchant sur les effets de la température d'élevage sur son développement ainsi que sur son

activité nerveuse et sécrétrice. Des études antérieures avaient souligné que la température semble exercer ses effets au cours de la 2<sup>ème</sup> et de la 3<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale (Bertin *et al.*, 1990a; Bertin *et al.*, 1990b). Ainsi, en isolant des rats de la naissance à P60 dans une chambre maintenue soit à 18°C, soit à 30°C, ces auteurs ont pu montrer que, 2 mois après le rétablissement d'une température normale (21-23°C), le renouvellement (« turnover ») de [NA] tritiée est augmenté au niveau du tissu adipeux brun, du foie et du pancréas chez les rats gardés à 18°C (Young *et al.*, 2002). Cette augmentation du renouvellement de NA indique que la température environnementale durant la vie précoce affecte le développement de l'activité sympathique à long terme. Il était donc possible que des modifications de l'innervation sympathique dirigée vers les tissus impliqués dans le métabolisme énergétique puissent participer à la programmation de pathologies métaboliques et cardiovasculaires. A ce propos les animaux élevés à 18°C développent une obésité lorsqu'ils ont un accès libre à de l'eau additionnée de 10% de saccharose (Young and Shimano, 1998). Cependant, cette obésité semble être indépendante de l'augmentation du tonus NA au niveau du tissu adipeux brun, ce qui pourrait évoquer l'installation d'une forme de résistance à la NA dans ce tissu.

L'activité sympathique périphérique dépend non seulement de la densité des fibres nerveuses, reflétée en partie par le « turnover » de la NA, mais également du contrôle nerveux exercé par les centres supraspinaux. Afin de s'assurer de l'intégrité des centres régulateurs, Young et coll. ont réalisé deux expériences (Young and Morrison, 1998). Dans un premier temps, les auteurs ont enregistré les taux plasmatiques de NA dans différentes conditions chez les animaux gardés à 18°C ou 30°C, afin d'obtenir une image de l'activité globale du SNS. Les animaux élevés à 18°C présentent une réduction du taux circulant de NA au repos et en réponse à une hypothermie, ce qui laisse sous-entendre une hypoactivation du SNS au niveau central. Afin de tester cette hypothèse, une injection de bicuculine (un antagoniste du récepteur à l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) a été réalisée dans le raphé pallidus, qui contient des neurones projetant vers les corps cellulaires des neurones préganglionnaires sympathiques situés dans la moelle épinière. Cette injection de bicuculine rétablit le taux de NA chez les animaux gardés à 18°C comparé aux animaux gardés à 30°C. En considérant que les synapses GABAergiques exercent des influences inhibitrices sur les neurones centraux contrôlant l'activité du SNS, ces résultats montrent l'existence d'un tonus inhibiteur accentué sur l'activité sympathique périphérique chez les animaux gardés à 18°C. Dans un deuxième temps, Young et coll. ont cherché à enregistrer les décharges sympathiques au niveau du tissu adipeux brun suite à une stimulation électrique directe

du raphé pallidus chez les animaux « thermiquement programmés » (Young and Morrison, 1998). Ils ont alors pu démontrer qu'une stimulation d'intensité équivalente provoque une activité accentuée des terminaisons sympathiques chez les animaux élevés à 18°C au cours de l'enfance. Ceci implique l'existence d'une amplification électrique plus importante entre le raphé pallidus et les neurones post-ganglionnaires, ce qui rend compte de capacités de réponses sympathiques accrues chez ces animaux. Des résultats similaires ont pu être observés au niveau des glandes sudoripares en fonction de la température rencontrée durant la jeunesse, ce qui appuie l'hypothèse de la plasticité du développement du SNS en réponse à des modifications de l'environnement précoce. De plus, cette sensibilité aux facteurs environnementaux semble, tout comme dans l'axe HHS, s'exercer à tous les niveaux du système SSR. Compte tenu de sa plasticité, le système SSR pourrait donc constituer une des cibles potentielles de la programmation de pathologies métaboliques et cardiovasculaires suite à des modifications de l'environnement précoce.

Dès la fin des années 60, Iversen et coll. avaient remarqué que chez les animaux issus de portées dont la taille avait été augmentée, ce qui réduit l'accès au lait maternel et constitue donc une réduction de l'apport nutritionnel, l'innervation sympathique du cœur était retardée (Iversen *et al.*, 1967). Depuis, bien que l'influence de la dénutrition maternelle sur le système SSR commence seulement à être reconsidérée, quelques études pionnières permettent de suspecter l'existence de troubles de son développement et de son activité suite à une limitation de la disponibilité en nutriments. Chez le mouton, bien que les animaux ayant subi une restriction maternelle alimentaire de 50% de la fécondation au 95<sup>ème</sup> jour de gestation présentent une augmentation de la pression artérielle similaire à celle des animaux témoins suite à l'infusion de NA par des cathéters implantés au niveau cardiaque, ils montrent une absence de la bradycardie observée chez les animaux témoins dans ces conditions (Gopalakrishnan *et al.*, 2004). Parallèlement, de telles modulations de l'innervation sympathique au niveau entérique ont été retrouvées chez le rat suite à une dénutrition prénatale de 50% appliquée au cours des deux dernières semaines de gestation (Santer and Conboy, 1990). Ces altérations sont également accompagnées de modifications du développement des neurones post-synaptiques du ganglion cœliaque entérique supérieur qui projettent vers le système nerveux entérique (Conboy *et al.*, 1987). La dénutrition protéique semble aussi affecter la mise en place du système SSR. En effet, et toujours chez le rat, une restriction protéique isocalorique durant la gestation et la lactation induit une diminution du « turnover » de NA au niveau de certains tissus, comme le cœur et l'intestin (Young and Morrison, 1998). De plus, les animaux présentent une altération du profil d'expression des

récepteurs adrénergiques  $R\alpha 2A$ ,  $R\beta 1$  et  $R\beta 3$  au niveau des adipocytes intra-abdominaux, sous-cutanés et épидидymaux (Petry *et al.*, 2000). Ainsi, une modulation de l'apport en protéines semble non seulement affecter l'innervation sympathique des tissus et organes, mais également entraîner des modifications de leur sensibilité à l'innervation sympathique, ce qui rappelle les résultats obtenus dans le modèle de « programmation thermique » (Young *et al.*, 2002; Young and Shimano, 1998). De même, une alimentation équilibrée énergétiquement mais enrichie en différents nutriments, comme les acides gras, le glucose ou le sel, entraîne des modifications de l'innervation sympathique des tissus associés au stimulus, tels que le tissu adipeux, le pancréas, et le rein respectivement (Young, 2006). Il semblerait également que l'augmentation de la disponibilité du glucose pour le fœtus, relative à un diabète gestationnel provoqué par l'injection d'un agent diabétogène, la streptozotocine<sup>26</sup> (30mg/kg au 2<sup>ème</sup> jour de gestation), entraîne elle aussi des modifications de l'innervation sympathique de certains tissus. En l'occurrence, la concentration de NA au niveau du cœur et du tissu adipeux blanc est augmentée au cours de la croissance postnatale (P22 et P64). Cependant, l'augmentation du taux de NA pancréatique n'est significative à aucun des stades postnatals étudiés. Globalement, des modifications quantitatives et qualitatives du régime maternel, qu'elles aillent dans le sens d'un défaut ou d'un excès, entraînent des adaptations spécifiques du développement et des fonctions du SNS chez la descendance selon le tissu cible, le stimulus nutritionnel et la période d'application.

De la même façon, le stress postnatal semble avoir une influence sur le développement du SNS. Par exemple, une manipulation de 15 minutes par jour, incluant une séparation de la mère, au cours de la lactation induit une réduction du renouvellement de NA au niveau du cœur et de la rate de 23% et 53% respectivement ainsi qu'une augmentation de la réponse des taux urinaires de NA à un jeûne de 3 jours chez le rat mâle adulte (Young, 2000). Ces animaux présentent par ailleurs une augmentation du poids des dépôts adipeux abdominaux sans modification de la proportion de masse grasse totale, ce qui reflète des différences dans la distribution des réserves graisseuses au sein de l'organisme. La manipulation néonatale semble donc induire une réduction de l'activité de certaines sous-unités du système sympathique (Young, 2000).

---

<sup>26</sup> La streptozotocine est une toxine bactérienne de type N-nitrosylée qui provoque, à haute dose, une destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, et induit ainsi un diabète de type-I

Exposition	Espèce	Période d'exposition	Réduction de la NA tissulaire	Age
Administration de dexaméthasone	Rat	Gestation	Cœur	Postnatal
Diabète	Rat	Gestation	Pancréas	Fœtal
Ingestion d'éthanol	Rat, Souris	Gestation	Thymus, Rate, TAB	Adulte
Injection de nicotine	Rat	Gestation	Foie, Rein	Postnatal
Restriction protéique	Rat	Gestation	Rate, Rein	
Ligature de l'artère utérine	Mouton	Gestation	TAB	Postnatal
Augmentation de la taille des portées	Rat	Lactation	Cœur, Rein, TAB	Adulte

*Young 2002, TRENDS in Endocrinology and Metabolism ; Young et Morrison 1998, Diabetes Care*

**Tableau 3 :** *Spécificité des tissus dont la densité de l'innervation sympathique (évaluée par le renouvellement de la NA) est réduite suite à différentes manipulations périnatales*

#### *La glande médullosurrénale*

Des modifications fonctionnelles de la glande médullosurrénale qui, rappelons-le, représente l'effecteur terminal du système SSR en libérant les catécholamines dans la circulation sanguine, ont également été caractérisées dans les différents modèles de programmation. Chez les animaux élevés à 18°C, Young et coll. ont rapporté une abolition de l'augmentation de la sécrétion d'A en réponse au jeûne, ce qui pourrait être impliquée dans l'obésité développée par ces animaux indépendamment de l'augmentation du tonus sympathique au niveau du tissu adipeux blanc (Young *et al.*, 2002). A l'inverse, le protocole de manipulation néonatale évoqué précédemment (prise en main et séparation de la mère 15 minutes par jour) induit, parallèlement à la réduction des influx sympathiques, une augmentation de l'activité de la glande médullosurrénale (Young, 2000). L'impact de la nutrition maternelle sur le développement et l'activité de la médullosurrénale reste cependant très largement méconnu (Young and Morrison, 1998). Une augmentation des taux de catécholamines plasmatiques en conditions basales a tout de même été décrite chez les rats âgés de 12 semaines suite à une dénutrition protéique au cours de la gestation et de la lactation (Young and Morrison, 1998). Cette augmentation de l'activité de la médullosurrénale est encore une fois accompagnée d'une réduction de la NA au niveau de différents tissus. Chez les animaux FR50 âgés de 4 mois, une étude réalisée en 2002 par Lesage et coll. a également décrit une diminution de la concentration plasmatique en noradrénaline (NA) en

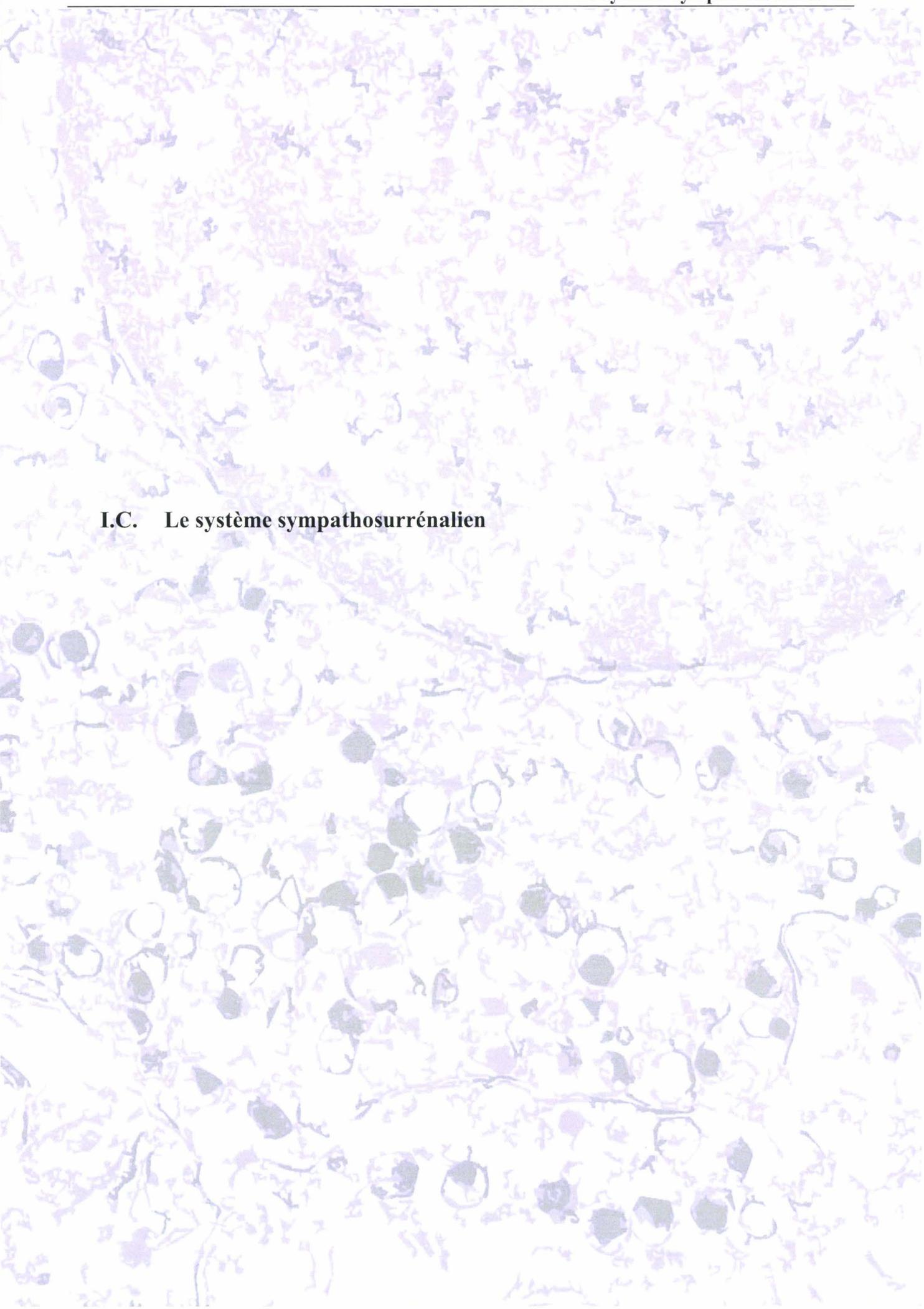
réponse à un stress par immobilisation, qui pourrait être du à l'augmentation du taux de glucocorticoïdes libres et du rétrocontrôle qu'ils exercent sur l'activité sympathosurrénalienne (Lesage *et al.*, 2002a). Ces résultats préliminaires laissent donc présumer que l'activité du système SSR puisse elle aussi être perturbée dans notre modèle. Parmi les mécanismes découlant d'une dénutrition maternelle et participant à de telles altérations, les modifications du taux de leptine au cours de la période postnatale semblent être impliquées. En effet, des injections de leptine de P0 à P10 entraînent une augmentation du contenu surrénalien en catécholamines à la fin du traitement (Trevenzoli *et al.*, 2007). A l'âge adulte (5 mois), les contenus surrénaliens, l'expression de la TH, ainsi que la sécrétion des catécholamines en conditions basales ou stimulée par la caféine sont augmentés. Ces altérations sont de plus associées à une hausse de la pression systolique et du rythme cardiaque, suggérant que la leptinémie au cours de la vie précoce influence le fonctionnement de la glande médullosurrénale, ce qui pourrait contribuer aux altérations des paramètres cardiovasculaires retrouvés dans les modèles de programmation nutritionnelle. Dans le même ordre d'idée, la réduction du métabolisme cellulaire du fœtus au travers d'une diminution de la pression en oxygène (10% O<sub>2</sub>) du 5<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de gestation chez le rat affecte de façon différentielle les stocks en catécholamines (Mamet *et al.*, 2002). Les auteurs ont effectivement pu noter une augmentation du contenu surrénalien en NA de E19 à P14, tandis que le contenu en A est réduit de E19 à P7. Au niveau protéique, l'activité TH est accrue à P3 et P14, ce qui concorde avec les taux surrénaliens de TH, tandis qu'elle est réduite à P68. L'hypoxie prénatale entraîne donc des changements majeurs dans les stocks surrénaliens en catécholamines au cours de la période postnatale précoce, et semble avoir des effets persistants chez l'adulte (Mamet *et al.*, 2002).

Des modifications de la structure de la glande médullosurrénale ont également été observées dans les modèles de surexposition du fœtus aux glucocorticoïdes. En effet, une injection unique de dexaméthasone au 16<sup>ème</sup> jour embryonnaire chez le rat induit une réduction du volume de la médulla et du nombre de CC au cours des deux premières semaines de vie postnatale (Manojlivic *et al.*, 1998). Cette réduction du tissu chromaffine est associée avec une réduction de la prolifération cellulaire de E20 à P5. A l'inverse, les CC semblent connaître une phase de récupération au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale, à en croire l'augmentation de l'index mitotique des cellules de la médullosurrénale durant cette période. De plus, ces altérations sont associées, à la naissance, à une réduction des contenus surrénaliens (Manojlivic *et al.*, 1998). Une injection chronique de dexaméthasone du 16<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour embryonnaire chez le rat entraîne

des modifications quelque peu différentes. A P14, la descendance présente une réduction du contenu surrénalien en A, du volume de la médulla ainsi que du nombre de CC, qui sont également associées à une diminution de la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces résultats indique qu'un excès de glucocorticoïdes durant la période de gestation au cours de laquelle se forme la médullosurrénale produit des effets inhibiteurs marqués sur la mise en place et l'activité des CC.

En conclusion, bien que les effets exercés par l'environnement périnatal soient d'une grande hétérogénéité, des altérations du système SSR sont fréquemment retrouvées chez les mammifères présentant un retard de croissance précoce. Chez l'homme, un faible poids de naissance est associé à une augmentation de la fréquence cardiaque et de la sécrétion des catécholamines pendant l'enfance, et à une augmentation de l'activité sympathique à l'âge adulte. Chez l'animal, une dénutrition périnatale aboutit globalement à une diminution de l'innervation sympathique de certains tissus ainsi qu'à une augmentation de l'activité de la glande médullosurrénale. Cette association récurrente ainsi que diverses données sur l'influence pathogène des catécholamines suggèrent que des adaptations du système SSR à des stimulations précoces pourraient s'avérer délétères une fois l'organisme vieillissant et contribuer à l'augmentation de la prévalence de l'obésité, de l'hypertension, et du diabète de type 2, programmés par l'environnement précoce (Young, 2002; Young, 2006; Young and Morrison, 1998). L'occurrence et la place de ces mécanismes dans les altérations découlant d'une dénutrition périnatale restent cependant très largement mal connues.

**I.C. Le système sympathosurrénalien**



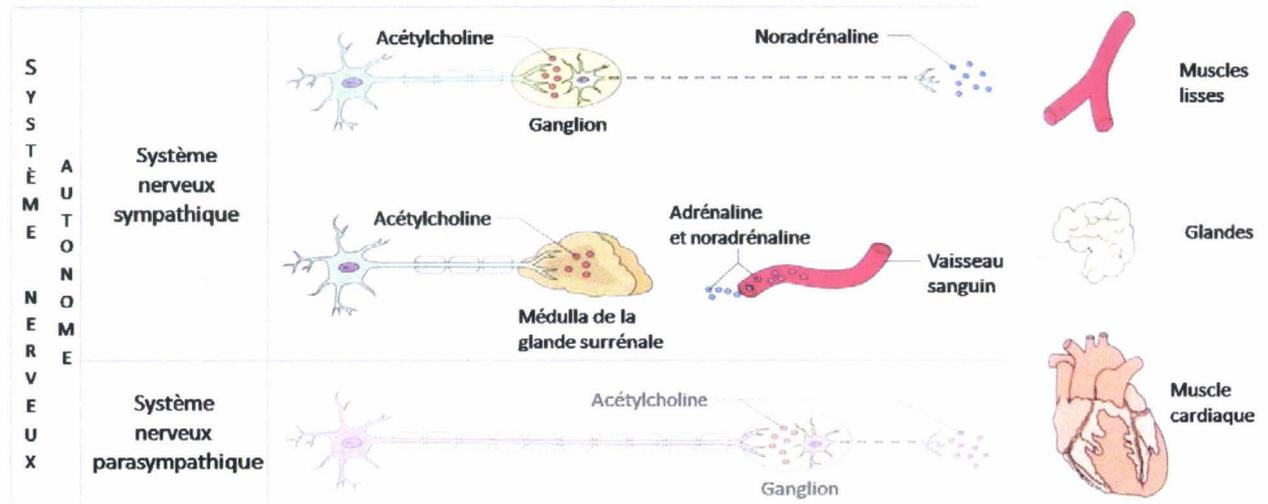
Le système SSR remplit des fonctions primordiales dans le maintien de l'homéostasie énergétique et cardiovasculaire à l'état basal. De plus, il constitue, avec l'axe HHS, un facteur clé dans la réponse au stress. Le système SSR se compose du système nerveux sympathique (SNS) et de la glande médullosurrénale. L'activité du système SSR exerce ainsi ses effets, d'une part, par le biais d'une stimulation nerveuse des organes cibles, et, d'autre part, à travers la libération des catécholamines (adrénaline (A), noradrénaline (NA), dopamine) dans la circulation générale par les CC de la médullosurrénale. Les catécholamines sont de puissants vasoconstricteurs et sont capables d'induire directement une résistance à l'insuline (Julius and Gudbrandsson, 1992; Paffenbarger *et al.*, 1968). D'un point de vue pathologique, les réponses à des stressseurs qui activent préférentiellement le système SSR sont associées à une athérosclérose carotidienne (Everson *et al.*, 1997) et à un accroissement de la masse du ventricule gauche (Allen *et al.*, 1997; Kamarck *et al.*, 2000). Par ailleurs, des études de suivi ont pu démontrer l'influence néfaste à long terme de tels stress et établir une relation avec la pression sanguine (Treiber *et al.*, 1996) et le développement d'une hypertension (Menkes *et al.*, 1989). Parallèlement, il semblerait que la sensibilité accrue des femmes aux effets délétères du vieillissement sur l'augmentation de la pression artérielle soit accompagnée d'une intensification plus importante du rythme des décharges sympathiques avec l'âge comparé aux hommes (Narkiewicz *et al.*, 2005). Les auteurs en concluent que l'activité du système sympathique doit contribuer de façon importante à l'influence plus marquée de l'âge sur la pression sanguine et les maladies cardiovasculaires chez la femme. Une perturbation des activités régulatrices du système SSR suite à un environnement périnatal délétère pourrait alors constituer un des processus étiologiques initiant à la fois la résistance à l'insuline et l'hypertension programmées durant la vie précoce (Phillips *et al.*, 2006; Phillips and Barker, 1997).

Afin d'envisager l'impact possible de l'environnement précoce sur l'activité du système SSR, il est tout d'abord nécessaire de rappeler l'organisation ainsi que le développement et la mise en place des neurones sympathiques et des CC de la médullosurrénale.

I.C.1. Description du système nerveux sympathique

*I.C.1.1. Le système sympathique*

Le SNS représente, avec le système nerveux parasympathique (SNPS) et le système nerveux entérique, une des 3 grandes unités neuronales qui constituent le système nerveux autonome. De façon globale, le système nerveux autonome va permettre le contrôle, par le SNC, de l'activité basale de différents tissus et organes, ainsi que les adaptations nécessaires de l'activité de ces tissus et organes au maintien de l'homéostasie quand l'organisme est confronté à des conditions environnementales particulières, telles que le stress ou l'activité physique. Dans ce but, le SNS et le système nerveux parasympathique vont exercer le plus souvent des effets antagonistes sur les organes, et ce par le biais de la libération de neuromédiateurs différents (figure 11). En effet, le système nerveux parasympathique va libérer de l'acétylcholine au niveau des organes cibles, encore qualifiés d'effecteurs, tandis que les terminaisons nerveuses distales du SNS vont sécréter de la NA. La présence de récepteurs catécholaminergiques au niveau des différents organes, ainsi que l'équilibre de l'expression des différents sous-types de récepteurs, confèrent au SNS des fonctions vaso-constrictrices, cardio-accéléatrices, hyperglycémiantes, bronchodilatatrices, intestino-inhibitrices et pupillo-dilatatrices. Parmi les organes qui reçoivent des afférences sympathiques, il est intéressant de noter la présence d'organes qui pourraient être impliqués dans des pathologies métaboliques et cardiovasculaires, tels que le cœur, le foie, le pancréas, le rein, et bien évidemment, les glandes surrénales.



Tiré de « Anatomie et physiologie humaines », Elaine N. Marieb, éditions De Boeck University

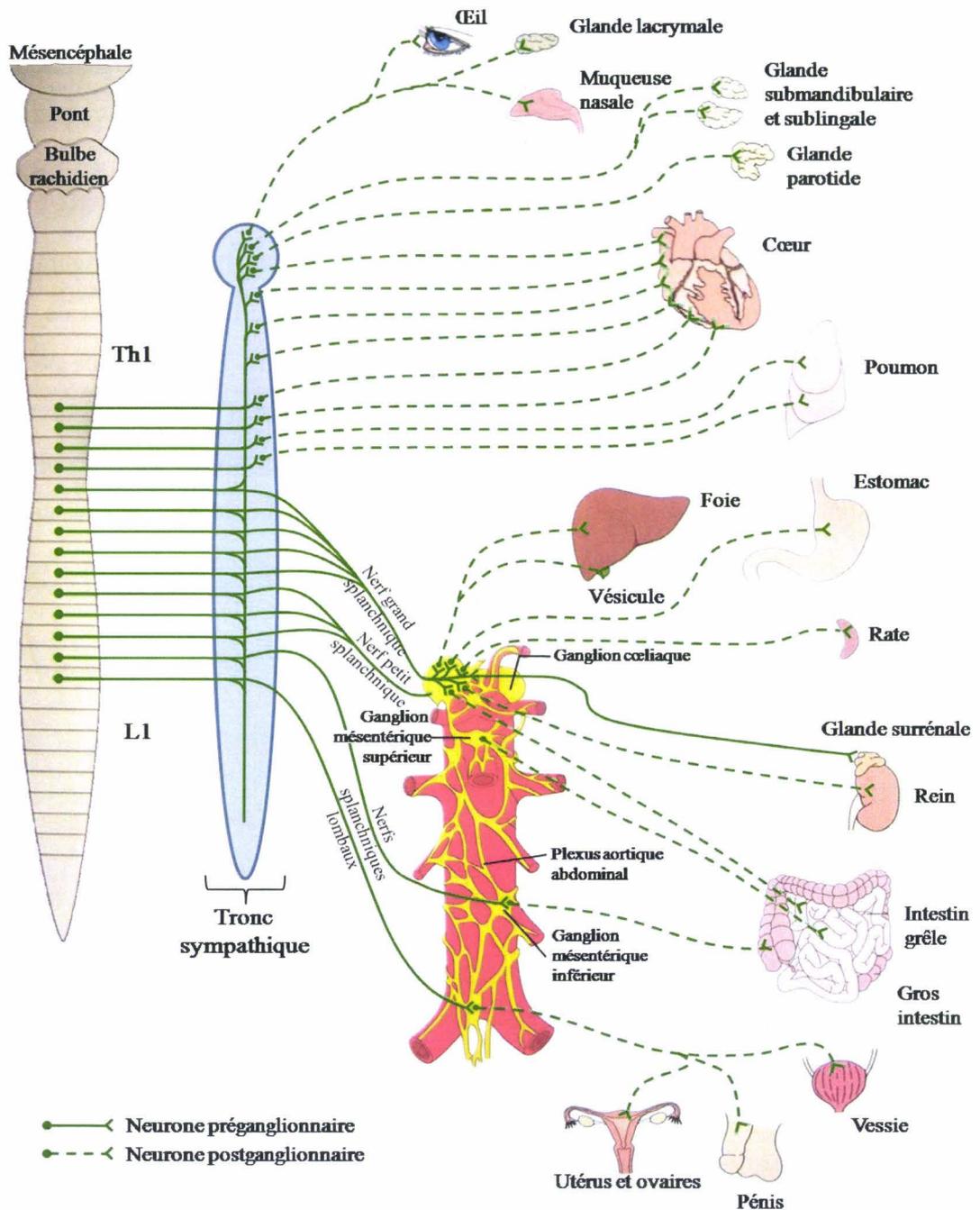
**Figure 11** : Neurones du SNS et du système nerveux parasympathique. Tandis que les neurones pré-ganglionnaires des deux systèmes ainsi que les neurones post-ganglionnaires du système nerveux parasympathique libèrent tous de l'acétylcholine, seuls les neurones post-ganglionnaires du SNS libèrent de la NA au niveau de leurs tissus cibles. La glande médullosurrénale reçoit quant à elle directement les projections pré-ganglionnaires sympathiques, et libère les deux catécholamines circulantes majeures : l'A et la NA. Ainsi, elle peut être considérée comme un ganglion sympathique

D'un point de vue anatomique, les voies de conduction du système nerveux sympathique prennent naissance dans la moelle épinière, établissent une synapse au niveau des ganglions, et se dirigent enfin vers des cibles diverses. Ces voies sont ainsi composées de 2 neurones : le premier neurone dit pré-ganglionnaire, dont le corps cellulaire est situé dans la moelle épinière, projette un axone vers les ganglions où se trouve le corps cellulaire du deuxième neurone, alors nommé post-ganglionnaire (figure 11). Le corps cellulaire des neurones pré-ganglionnaires du système SSR se situe dans la corne latérale de la moelle épinière, entre les segments médullaires thoraciques Th1 et L2. Ils projettent leurs fibres par la racine ventrale des nerfs rachidiens et les rameaux communicants, soit vers les ganglions prévertébraux (coeliaque, mésentériques supérieur et inférieur ; Th5 à L2), soit vers les ganglions de la chaîne ganglionnaire latéro-vertébrale ipsilatérale, encore appelée tronc sympathique (Th1 à Th6) (figure 12). Les ganglions des chaînes latéro-vertébrales, qui se situent de part et d'autre de la colonne vertébrale, s'étendent du cou au bassin et sont généralement retrouvés au nombre de 23 (paires). Les ganglions prévertébraux, dont les plus importants sont les ganglions mésentériques supérieur et inférieur et cœliaques, sont quant à eux situés à l'avant de la moelle épinière, au contact de l'aorte abdominale, et présentent une organisation qui n'est ni symétrique ni segmentaire. Les axones des neurones pré-ganglionnaires,

qui synthétisent de l'acétylcholine (figures 10 et 11), vont, une fois qu'ils ont atteint un ganglion, soit établir des synapses<sup>27</sup> avec le corps cellulaire des neurones postganglionnaires situés directement dans le même ganglion, soit monter ou descendre dans le tronc sympathique et établir des contacts dans un autre ganglion du même tronc sympathique, soit émerger du ganglion sans faire synapse et former les nerfs splanchniques. Ces derniers vont alors innerver la glande médullosurrénale (nerfs grands splanchniques) ainsi que les ganglions prévertébraux (figure 12). Les neurones postganglionnaires, qui acquièrent un phénotype NA au cours de leur migration embryonnaire, sont localisés dans le tronc sympathique et dans les ganglions prévertébraux, et projettent directement sur les organes cibles du SNS. Les effets du SNS sur ses organes effecteurs s'exercent donc, d'une part, de façon ciblée et indépendante au travers de la libération de NA par les terminaisons nerveuses postganglionnaires, la NA jouant alors le rôle de neurotransmetteur, et, d'autre part, de façon plus ubiquiste par la libération des catécholamines (NA et A) dans la circulation sanguine, qui jouent alors le rôle d'hormones (figure 11).

---

<sup>27</sup> Un neurone préganglionnaire établit des synapses avec, en moyenne, 200 neurones postganglionnaires, ce qui permet une amplification du signal émis au niveau médullaire.



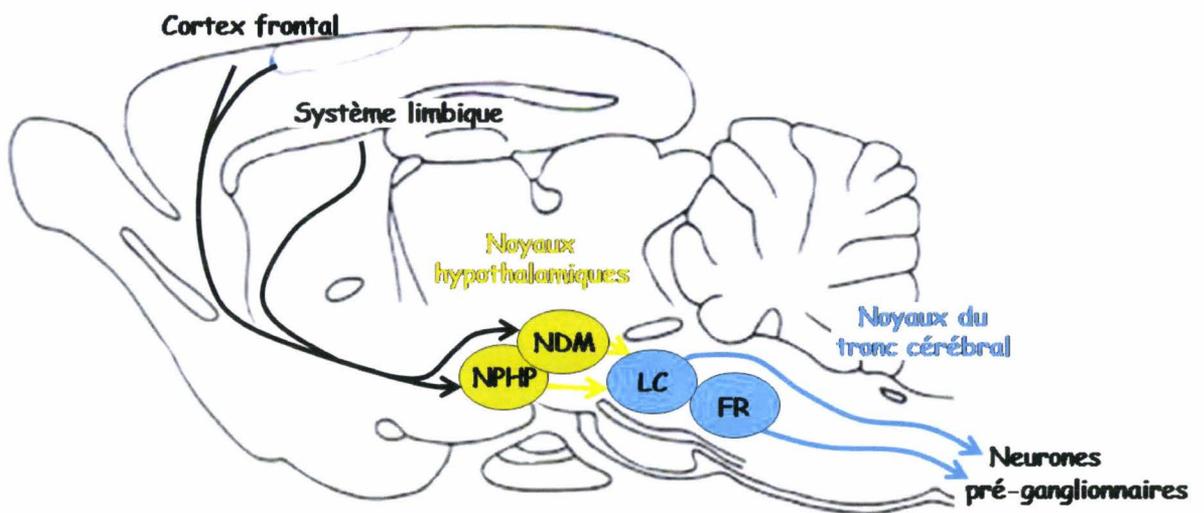
Tiré de « Anatomie et physiologie humaines », Elaine N. Marieb, éditions De Boeck University

Figure 12 : Anatomie du système sympathosurrénalien

Enfin, il est nécessaire de considérer que le système SSR semble être composé de sous-unités fonctionnelles multiples (probablement plusieurs dizaines), comme en témoigne l'organisation segmentaire des fibres sympathiques et la spécificité des organes innervés en fonction du niveau d'origine de ces mêmes fibres (figure 12) (Janig and McLachlan, 1992). Selon Young, chacune de ces subdivisions pourrait être affectée à des périodes et par des influences

environnementales différentes et propres à chacune d'entre elles (Young, 2002), ce qui est corroboré par la variabilité des effets d'un environnement précoce délétère. Ainsi, la structure et la fonctionnalité du système SSR serait propre à chaque individu et représenterait la somme des influences environnementales auxquelles l'organisme a été exposé au cours de son développement.

### I.C.1.2. Contrôle central



**Figure 13** : Contrôle central du système SSR. Le cortex frontal et le système limbique projettent sur les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation des centres nerveux du tronc cérébral qui contrôlent l'activité des neurones pré-ganglionnaires du SSR. noyau dorso-médian : NDM ; NPHP : noyau postérieur de l'hypothalamus postérieur ; LC : locus coeruleus ; FR : formation réticulée.

L'activité du SNS est soumise au contrôle du SNC par l'intermédiaire de centres intégrateurs et moteurs situés à différents niveaux du cerveau (figure 13). Le corps cellulaire des neurones pré-ganglionnaires, localisé dans la corne latérale de la moelle épinière, reçoit des projections des centres moteurs localisés dans la formation réticulaire (noyaux A1, C1, A2, C2) et le locus coeruleus (noyaux A5, A6, A7) du tronc cérébral (Sun, 1995). Ces mêmes centres sont placés sous le contrôle des noyaux dorsomédian de l'hypothalamus latéral et postérieur de l'hypothalamus postérieur, servant ainsi de relais entre le cerveau et le système SSR. L'intégration de toutes ces afférences détermine le niveau de l'activité sympathique ainsi que le tonus vasculaire (Sun, 1995). La régulation par l'hypothalamus de l'activité cardiaque, de la pression artérielle, des fonctions endocrines, de la température corporelle et de l'équilibre hydrique s'effectue ainsi

partiellement via son contrôle sur les centres moteurs du SNS. Bien que l'activité du système SSR résulte majoritairement de l'intégration, par l'hypothalamus, des signaux homéostatiques corporels, autonomes et centraux, ce dernier reçoit également des afférences du système limbique ainsi que du cortex cérébral. D'une part, l'activité du SNS est soumise à un contrôle émotionnel, considérant que c'est la réaction émotionnelle du système limbique au danger et à une situation génératrice d'anxiété qui va signaler à l'hypothalamus de régler le SNS en mode « fight or fly »<sup>28</sup>. D'autre part, le cortex cérébral participe aussi, et de façon plus disparate et éloignée, à la régulation des fonctions végétatives. Ce contrôle se manifeste à son paroxysme par la « réaction biologique », phénomène qui correspond à la maîtrise consciente des activités viscérales, comme le rythme cardiaque, même si cette capacité demeure inexploitée chez la plupart des individus.

---

<sup>28</sup> Littéralement « combat ou fuite »

#### I.C.2. Embryogénèse des cellules de la lignée sympathosurrénalienne

Afin de bien comprendre les effets potentiels de l'environnement précoce sur l'activité du système SSR à l'âge adulte, il est nécessaire de saisir, dans ses grandes lignes, le développement et la mise en place des cellules du système SSR. Comme nous allons le voir, les cellules qui composent le système SSR proviennent toutes de précurseurs communs, les précurseurs de la lignée SSR, qui sont eux-mêmes issus des cellules de la crête neurale (CCN).

##### *I.C.2.1. Les cellules de la crête neurale*

Au 15<sup>ème</sup> jour du développement de l'embryon humain, le feuillet ectodermique donne naissance à la plaque neurale, qui va alors se courber sur tout son long et former la gouttière neurale, présumptive de la moelle épinière et des vertèbres. Les cellules situées aux sommets de la gouttière neurale vont se différencier et subir une transition épithélio-mésenchymateuse sous l'influence complémentaire de molécules de la famille du transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), et tout particulièrement les « Bone Morphogenic Protein » (BMP) (Huber, 2006), des « Fibroblast Growth Factor » (FGF) et Wnts<sup>29</sup> (Garcia-Castro *et al.*, 2002; LaBonne, 2002) ainsi que de l'acide rétinolique et de Notch (Cornell and Eisen, 2005), donnant naissance aux crêtes neurales (Steventon *et al.*, 2005). Entre autre, l'induction fournie par les BMP permet l'établissement d'une zone de compétence sur la bordure du neurectoderme tandis que l'influence subséquente des Wnts fournit un signal qui termine la différenciation des CCN (Raible, 2006b; Raible and Ragland, 2005). Le rôle des membres de la famille des Wnt semble prédominant puisque la suppression de leur signalisation via les  $\beta$ -caténines prévient la formation de la crête neurale, qui peut être restaurée par la simple administration exogène de ces molécules (Garcia-Castro *et al.*, 2002). Quoiqu'il en soit, en aval de l'ensemble de ces acteurs réside l'expression de facteurs de transcriptions, tels que Pax, Msx (Raible, 2006), Sox10 (Kelsh, 2006), Snail/Slug, SoxE FoxD3 ou encore c-Myc (Barembaum and Bronner-Fraser, 2005) qui vont permettre l'intégration des différents signaux et l'établissement de la crête neurale. Parallèlement, bien que Sonic hedgehog soit profondément impliqué dans la neurulation ainsi que dans l'acquisition de l'axe rostro-caudal, son influence sur les CCN semble limitée à une inhibition de leur migration via la modulation des capacités d'adhésion (Testaz *et al.*, 2001).

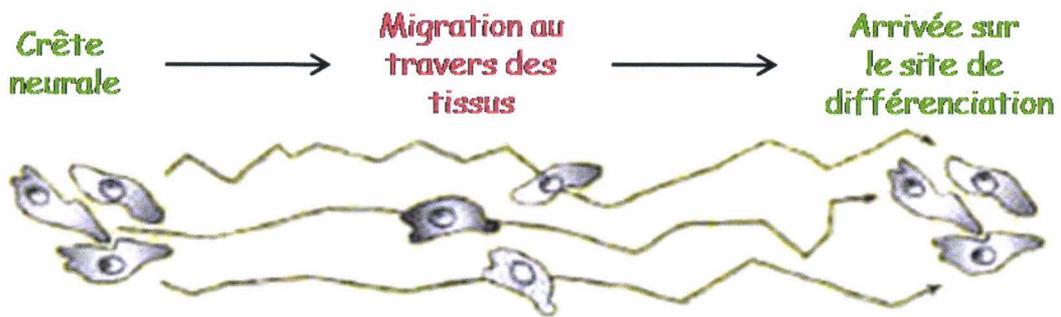
---

<sup>29</sup> Glycoprotéine riche en cystéine sécrétée

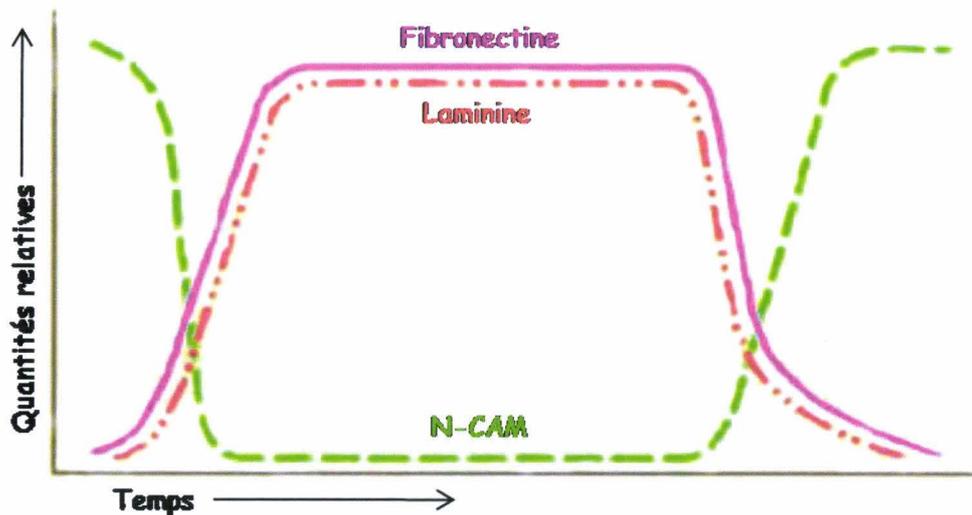
*I.C.2.2. Migration*

En synergie avec ces voies de signalisation, la transition G1/S dans le cycle cellulaire va permettre aux cellules du neurectoderme de rentrer en migration, ce qui constitue une étape permissive dans la différenciation des CCN (Kalcheim and Burstyn-Cohen, 2005). En effet, une des caractéristiques majeures des CCN est leur délamination des crêtes neurales et leur migration au travers de l'organisme vers les différentes destinations. L'initiation de la migration des CCN est un processus morphogénique complexe qui nécessite l'action coordonnée de molécules d'adhésion, de protéines du cytosquelette, de facteurs de transcription et de molécules de la matrice extracellulaire, qui sont soumises aux facteurs de l'environnement (Christiansen *et al.*, 2000b; Kalcheim, 2000; Nieto, 2001). La synchronisation du profil d'expression des molécules d'adhésion par les CCN ainsi que de la composition de la matrice extracellulaire est d'une importance primordiale pour assurer la motilité des CCN. Le départ de la crête neurale correspond à une forte augmentation de la fibronectine dans la matrice et de l'expression des laminines par les cellules migrantes, parallèlement à une réduction drastique de l'expression des molécules neuronales d'adhésion cellulaire (N-CAM, figure 14) (Christiansen *et al.*, 2000a; Kalcheim, 2000). A l'inverse, l'environnement rencontré au niveau des tissus cibles initie la répression de ces mêmes facteurs pro-migratoires et la réexpression des N-CAM, induisant ainsi un retour à un profil plus « statique » des CCN qui terminent alors leur migration. Par exemple, des facteurs tels que les TGF- $\beta$ 1 et 2 (Delannet and Duband, 1992), BMP4 et Noggin (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999), les Wnt (Wu and Suzuki, 2006) et globalement les mêmes facteurs que ceux intervenant dans la différenciation des CCN, ont été impliqués dans l'initiation de leur migration (Kalcheim and Burstyn-Cohen, 2005; Unsicker *et al.*, 1997).

## Migration des cellules de la crête neurale



### Modifications des molécules d'adhésion et de la matrice extracellulaire



D'après le professeur Danton H. O'Day

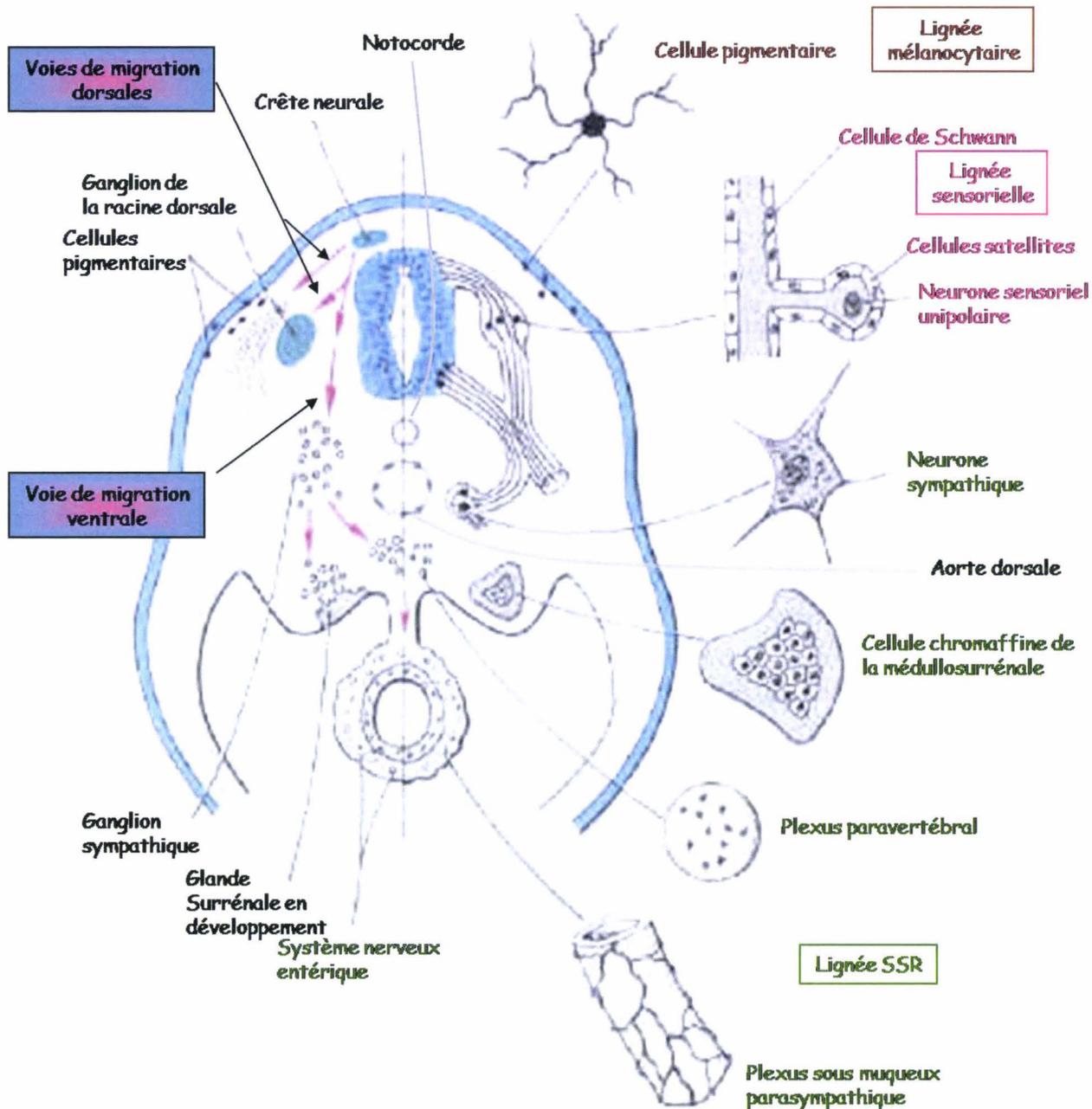
Figure 14 : Profil d'expression des molécules d'adhésion et de la matrice extracellulaire avant, pendant, et après la migration des cellules de la crête neurale

Les travaux réalisés par Nicole Le Douarin ont grandement participé à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des cellules de la crête neurale en divers précurseurs et progéniteurs (Le Douarin *et al.*, 2004; Le Douarin and Dupin, 2003; Kalcheim and Burstyn-Cohen, 2005). Les CCN étant douées d'une immense plasticité, elles participent virtuellement à la formation de tous les organes chez les vertébrés, et sont considérées comme un véritable 4<sup>ème</sup> feuillet embryonnaire (Le Douarin *et al.*, 2004; Le Douarin and Dupin, 2003). Brièvement, la figure 15 présente les principales lignées issues des CCN, parmi lesquelles

on compte les lignées sensorielle, mélanocytaire et SSR (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2006), ainsi que les voies de migration qui leur sont associées.

Quoi qu'il en soit, le débat sur l'occurrence temporelle de la spécification du destin des CCN reste toujours ouvert. D'une part, la spécification de ces différentes lignées est sous l'influence de facteurs, rencontrés au cours de la migration et au niveau des tissus cibles, qui vont entraîner des restrictions dans la multipotentialité des CCN et aboutir à un phénotype final différencié et adapté à la cible. Précisément, les cellules des lignées mélanocytaire et sensorielle empruntent les voies de migration dorsales, tandis que les cellules de la lignée SSR empruntent la voie de migration ventrale. D'autre part, un nombre croissant d'arguments est en faveur d'une spécification plus précoce des lignées, comme le montre, entre autre, des études réalisées *in vitro* sur des explants issus de différents segments de la crête neurale (Crane and Trainor, 2006; Harris and Erickson, 2007).

Les précurseurs SSR cheminent le long de la notocorde entre le tube neural et le ganglion de la racine dorsale, pour atteindre le mur de l'aorte dorsale thoraco-lombaire (figure 15), où ils s'agrègent alors pour former les ganglions sympathiques primaires dès E10 chez le rat (Anderson, 1993a; Anderson, 1993b; Unsicker, 1993). De façon générale, les précurseurs SSR migrent vers des localisations totalement dispersées au sein de l'organisme (figure 15), donnant naissance à des populations majeures au niveau des ganglions sympathiques et de la glande surrénale, ainsi qu'à des populations plus minoritaires situées au niveau des paraganglions et du corps carotidien, bien que des controverses subsistent sur l'origine SSR de ce dernier (Le Douarin N. *et al.*, 1972). De la même façon, une sous-population des neurones entériques proviendrait de la lignée SSR (Blaugrund *et al.*, 1996). Les cellules issues de la lignée SSR comprennent à la fois des neurones, situés en grande majorité dans les ganglions sympathiques et la glande médullosurrénale, et différents phénotypes de cellules neuroendocrines chromaffines, établis sur des spécificités morphologiques ainsi que dans les neurotransmetteurs qu'ils expriment. Ainsi, on distingue, d'une part, les deux populations majeures de cellules chromaffines NA et A, et, d'autre part, la population très faiblement représentée de cellules « Small Intensely Fluorescent » (SIF) ou « Small Containing Granules » (SCG).



D'après le professeur Danton H. O'Day

**Figure 15 :** Tissus et cellules dérivés de la crête neurale. L'environnement rencontré lors de leur migration, ainsi que les interactions cellulaires orientent la différenciation des CCN vers trois lignées distinctes: 1) la lignée mélanocytaire, 2) la lignée sensorielle, 3) la lignée SSR (SSR). La lignée SSR est la seule à emprunter la voie ventrale de migration jusqu'à proximité de l'aorte dorsale. Une partie des cellules SSR continue sa migration en direction de la surrénale en développement

*I.C.2.3. Induction et différenciation des précurseurs sympathosurrénaliens*

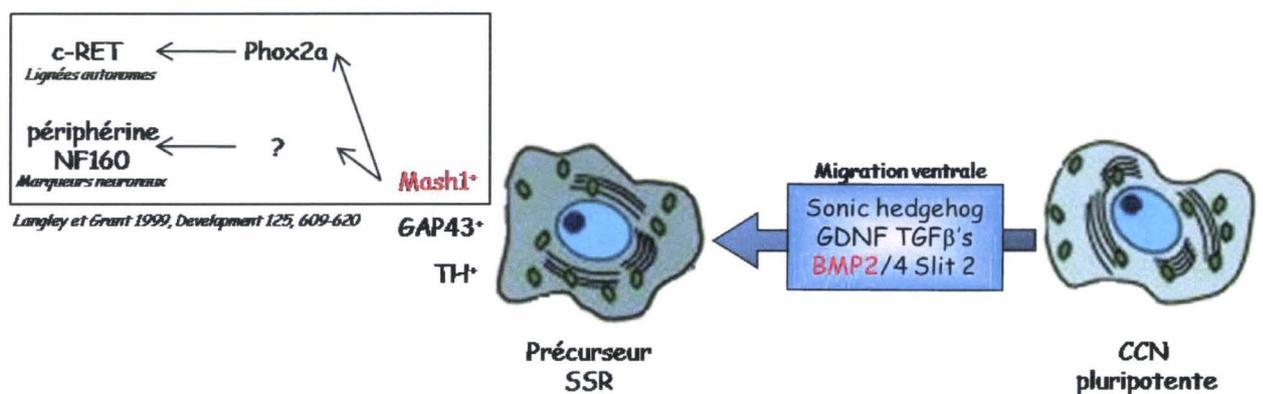
Les précurseurs SSR ont besoin à la fois de facteurs diffusibles et de molécules de la matrice extracellulaire pour assurer leur différenciation et leur développement au cours de l'embryogenèse, ainsi que pour le maintien de l'expression des neurotransmetteurs et leur survie à l'âge adulte (Anderson, 1993a; Anderson, 1993b; Cowen and Gavazzi, 1998; Unsicker, 1993). Une grande partie des propriétés communes aux cellules qui constituent cette lignée découlent de l'influence déterminante des signaux rencontrés au niveau de leur localisation originelle, la crête neurale, et au cours des stages initiaux de leur migration, qui sont dérivés à la fois de la notochorde, du plancher neural, du tube neural ventral, ou du mésoderme des somites (Anderson, 1993a; Anderson, 1993b; Groves *et al.*, 1995; Howard and Bronner-Fraser, 1985; Howard and Bronner-Fraser, 1986; Schober *et al.*, 2000; Teillet and Le Douarin, 1983; Unsicker *et al.*, 1997). Les neurotrophines, comme le « Nerve Growth Factor » (NGF) et la neurotensine (NT) 3, ainsi que des membres de la superfamille du TGF- $\beta$  font partie des facteurs diffusibles qui ont particulièrement été associés au développement de la lignée SSR. Plus précisément, il est communément admis que les facteurs neurotrophiques de la famille du TGF- $\beta$  produits par l'aorte dorsale (BMP-2 et 4, TGF- $\beta$ 2 et 3), le tube neural ventral (BMP-4 et 7) et la notochorde (TGF- $\beta$ 2 et 3), ainsi que des facteurs du microenvironnement (« Glial Derived Neurotrophic Factor » (GDNF), Sonic Hedgehog) vont permettre la différenciation des CCN en précurseurs SSR, qui acquièrent alors un phénotype catécholaminergique marqué par la synthèse de la tyrosine hydroxylase ou TH (figure 16) et la production de NA (Bilodeau *et al.*, 2000; Reissmann *et al.*, 1996; Unsicker *et al.*, 1997). La différence de réponses des sous-populations de progéniteurs SSR aux différents membres de la superfamille des TGF- $\beta$  (Fann and Patterson, 1994a) suggère qu'ils expriment le type I ou le type II des récepteurs sérine-thréonine kinase à des stades différents du développement (Langley and Grant, 1999). Bien que les données concernant l'expression des sous-unités des récepteurs aux BMP restent très limitées, le récepteur de type I a tout de même été détecté dès E15 dans les ganglions sympathiques chez le rat (Soderstrom *et al.*, 1996). Parallèlement, Fann et Paterson ont montré que le BMP-2, le BMP-6 et l'activine A contrôlent le niveau des enzymes de synthèse de différents neuropeptides ainsi que des catécholamines dans les neurones sympathiques (Fann and Patterson, 1994a). De plus, le BMP-2 induirait l'expression du récepteur TrkC au « Brain Derived Neurotrophic Factor » (BDNF) dans les cellules SCG sympathiques dès E15, ce qui leur conférerait alors une sensibilité à la NT-3 (Zhang *et al.*, 1998). Contrairement à l'influence stimulatrice des BMPs sur l'acquisition d'un phénotype

noradrénergique, l'administration d'activine A à des neurones sympathiques en culture induit la synthèse de l'ARNm codant l'acétylcholine-transférase, témoignant de l'acquisition de caractères cholinergiques (Coulombe and Kos, 1997; Zhang *et al.*, 1998). Un autre facteur de la famille des TGF- $\beta$ , le GDNF, semble fortement impliqué dans le développement des neurones sympathiques NA, comme le montre l'étude des souris invalidées pour ce gène (Granholm *et al.*, 1997). De plus, l'absence de la sous-unité Ret du récepteur au GDNF induit une augmentation massive de l'apoptose dans les cellules ganglionnaires, dont la survie est donc fortement dépendante du GDNF (Morin *et al.*, 1997).

Un certain nombre d'autres facteurs semble tout de même intervenir dans la différenciation de la lignée SSR. Par exemple, il a été montré que les glucocorticoïdes contrôlent le niveau de plusieurs protéines exprimées par les différents types de cellules SSR. Parmi celles-ci figurent la leucine-enképhaline (Leu-Enk) (Henion and Landis, 1992; Yanase *et al.*, 1984) ainsi que des transporteurs membranaires d'amines (Wakade *et al.*, 1996) dans les neurones sympathiques et les CC. De même, bien que les neurones sympathiques n'expriment pas le gène de l'IGF2, son ARNm a été retrouvé dans les cellules SIF ainsi que dans les CC extra-surréaliennes localisées dans les paraganglions (Hedborg *et al.*, 1995). Un certain nombre de facteurs, regroupés sous le terme de la famille de cytokines neuropoïétiques, en raison de leur action parallèle sur des cellules des systèmes nerveux et hématopoïétique, semblent aussi impliqués dans la régulation des enzymes de synthèse des catécholamines et des peptides. Ainsi en témoignent les effets de la cholécystokinine, l'Enk, la somatostatine, la substance P et le VIP, sur des neurones SSR en culture (Fann and Patterson, 1994). Des facteurs de la famille du TGF- $\beta$  ont aussi été incriminés dans la régulation de l'expression de peptides, comme l'Activine A, le BMP-2 et le BMP-6 (Coulombe *et al.*, 1993; Fann and Patterson, 1994a).

L'existence de molécules spécifiquement exprimées à certains stades de la différenciation des cellules de la lignée SSR, telles que le « Mammalian achate schute Homolog » (Mash) 1, la tyrosine hydroxylase (TH) ou encore la neuromoduline, ou « Growth Associated Protein 43 » (GAP-43), ainsi que par certaines populations distinctes a permis de suivre et de mieux appréhender la complexité de l'acquisition d'un phénotype SSR (Langley and Grant, 1999). En effet, le développement de la lignée SSR et le maintien du phénotype pré-neuronal catécholaminergique (expression de la TH) nécessitent l'induction du facteur de transcription pro-neuronal Mash1, entre autre par le BMP2 (figure 16) (Lo *et al.*, 1998). Mash1 va ensuite permettre l'expression du facteur de transcription Phox2a, facteur restrictif pour l'acquisition de caractères

spécifiques des lignées autonomes (Hirsch *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1998), comprenant la lignée SSR. De plus, Mash1 semble coupler l'expression de marqueurs pro-neuronaux, comme la périphérine et le neurofilament NF160, et de composants spécifiques des lignées autonomes, tel que c-RET (Lo *et al.*, 1998). Par ailleurs, le rôle crucial de facteurs tels que Mash 1, Cash1 et Phox 2, un marqueur commun à toutes les cellules catécholaminergiques (Valarche *et al.*, 1993), au cours des phases précoces de la migration a été démontré (Anderson *et al.*, 1997; Ernsberger *et al.*, 1995). Il a également été décrit que l'expression de Ret est partiellement régulée par Phox-2a, suggérant que le contrôle exercé par ce dernier sur l'acquisition d'un phénotype NA puisse s'effectuer en partie par la modulation de la signalisation de GDNF (Morin *et al.*, 1997). Parallèlement, l'expression de la protéine GAP-43, ou neuromoduline, est commune à beaucoup de cellules de type neuronal possédant des capacités migratoires ainsi qu'une certaine plasticité membranaire, telles que les précurseurs SSR. La neuromoduline est ainsi retrouvée à la fois au niveau des cônes de croissance et du réseau cytosquelettique sous-membranaire. Elle semble impliquée dans la transduction de signaux extracellulaires relatifs à la guidance et la régénération axonale (Benowitz and Routtenberg, 1997; Shen *et al.*, 2002; Yu and Bargmann, 2001). Parallèlement, les molécules impliquées dans le transport des amines localisées sur les organites cellulaires de sécrétion pourraient aussi modifier la réponse en influant directement sur le contenu des granules chromaffines. En effet, les « Vesicular Membrane Amine Transporter » (VMAT) 1 et 2 ne sont pas exprimés de façon similaire par les cellules neuronales et endocrines provenant des précurseurs SSR, ce qui fournit un mécanisme de base pour les différences pharmacologiques et physiologiques de stockage des monoamines dans ces deux phénotypes (Erickson *et al.*, 1996).



**Figure 16** : Principaux facteurs impliqués dans l'induction des précurseurs SSR. La majorité de ces facteurs est rencontrée au cours de leur migration le long de la voie ventrale, et induit l'expression de marqueurs neuronaux, dont Mash1. Ce facteur de transcription permet ensuite l'induction de marqueurs des lignées autonomes, via l'expression de Phox2a, et neuronaux

La divergence dans l'expression de protéines spécifiques par les membres issus de cette lignée résulte alors de l'influence des facteurs produits par l'environnement et rencontrés au niveau du tissu cible. Dans ce sens, la différenciation et la maturation des neurones sympathiques interviennent préalablement à celle des CC (Langley and Grant, 1999), et ce, dès l'accumulation des précurseurs SSR au niveau des futurs ganglions sympathiques (au stade E10). La combinaison de l'action des molécules rencontrées au niveau de l'aorte dorsale, dont certains facteurs chimiotropiques de la famille des Slit (De Bellard *et al.*, 2003; Hu, 1999), va ensuite permettre à une sous-population des précurseurs SSR de poursuivre sa migration en direction soit du plexus paravertébral et des intestins, formant ultérieurement le système nerveux entérique, soit du primordium surrénalien afin d'y constituer la médullosurrénale, incluant ses CC et ses neurones ganglionnaires. Parallèlement, une partie des précurseurs SSR va rester à proximité de l'aorte dorsale et donner naissance aux ganglions sympathiques prévertébraux ainsi qu'à la chaîne ganglionnaire latéro-vertébrale. Ainsi, bien que les facteurs rencontrés au cours de la migration semblent effectivement jouer un rôle fondamental dans la restriction et la spécification du destin des cellules précurseurs de la lignée SSR, il existerait des sous-populations distinctes qui exprimeraient ou non, avant leur arrivée au niveau du mur de l'aorte dorsale, les divers sous-types de récepteurs aux molécules de l'environnement, répondant ainsi différemment aux signaux rencontrés. Parmi ces sous-populations se trouvent des cellules capables de poursuivre leur migration au-delà de l'aorte dorsale et en direction du blastème surrénalien, qui, donnant naissance aux CC de la médullosurrénale, ont été baptisées chromoblastes.

### I.C.3. Ontogenèse de la glande médullosurrénale

L'ensemble des processus qui régissent la mise en place des cellules de la médullosurrénale se déroulent majoritairement de la dernière semaine de gestation (E14) à la deuxième semaine de vie postnatale (P14) chez le rat. Ils aboutissent à la formation d'une médullosurrénale mature constituée principalement, comme dans la plupart des espèces, de groupes homophénotypiques de CC A (80%) ou NA (20%), entourés par un tissu interstitiel de type mésenchymateux. Les cellules « Small Intensely Fluorescent » (SIF) ou « Small Containing Granules » (SCG), dont la fonction reste encore mal connue dans la surrénale, représentent moins de 1% de la population des CC (Langley and Grant, 1999). Nous détaillerons ici les mécanismes principaux qui accompagnent la mise en place des cellules A et NA, de leur innervation, ainsi que les conséquences structurales et fonctionnelles des différences phénotypiques existant entre ces deux types cellulaires.

#### *I.C.3.1. Colonisation du cortex surrénalien et différenciation des cellules chromaffines*

##### *Colonisation du cortex surrénalien*

Comme nous l'avons vu précédemment, les précurseurs SSR se différencient en neurones ou en cellules SIF dans les ganglions sympathiques primaires, ou continuent leur migration de l'aorte dorsale vers le cortex surrénalien primitif sous l'influence de facteurs chimiotropiques non identifiés. Ces précurseurs, dont la pluripotence serait alors restreinte aux phénotypes médullaires, i.e. les CC A, NA, les cellules SIF/SCG et les neurones sympathiques intramédullaires, constituent la sous-lignée SSR des chromoblastes. Ces chromoblastes possèdent des caractéristiques neuronales (neurofilament 3 ou NeuF3, GAP-43) et s'agrègent à proximité de la surrénale pour former le blastème médullaire au cours du 13<sup>ème</sup> jour embryonnaire. Ils pénètrent ensuite le cortex surrénalien et colonisent la région centrale de la glande surrénale, une fois encore sous l'influence de facteurs non identifiés (E14 à E15) (figure 17). Deux populations de chromoblastes semblent être présentes dans la glande surrénale au cours des stades précoces de l'ontogenèse et représenteraient les précurseurs respectifs des CC et des neurones médullaires (Henion and Landis, 1990). Sous l'influence du microenvironnement local, la majorité des chromoblastes perd alors ses caractéristiques neuronales et se différencie en CC (à partir de E15) de type A, NA (figure 17) et, de façon très minoritaire, en cellules SIF (Langley and Grant, 1999). A ce propos et nous y reviendrons par la suite, il est important de noter que les CC NA conservent l'expression d'un certain nombre de protéines neuronales et possèdent donc un phénotype endocrinien moins différencié, contrairement aux CC A. Parallèlement à cette différenciation neuroendocrine, de rares cellules conservent leur phénotype neuronal et se différencient en neurones postganglionnaires sympathiques intramédullaires (de type I et II).

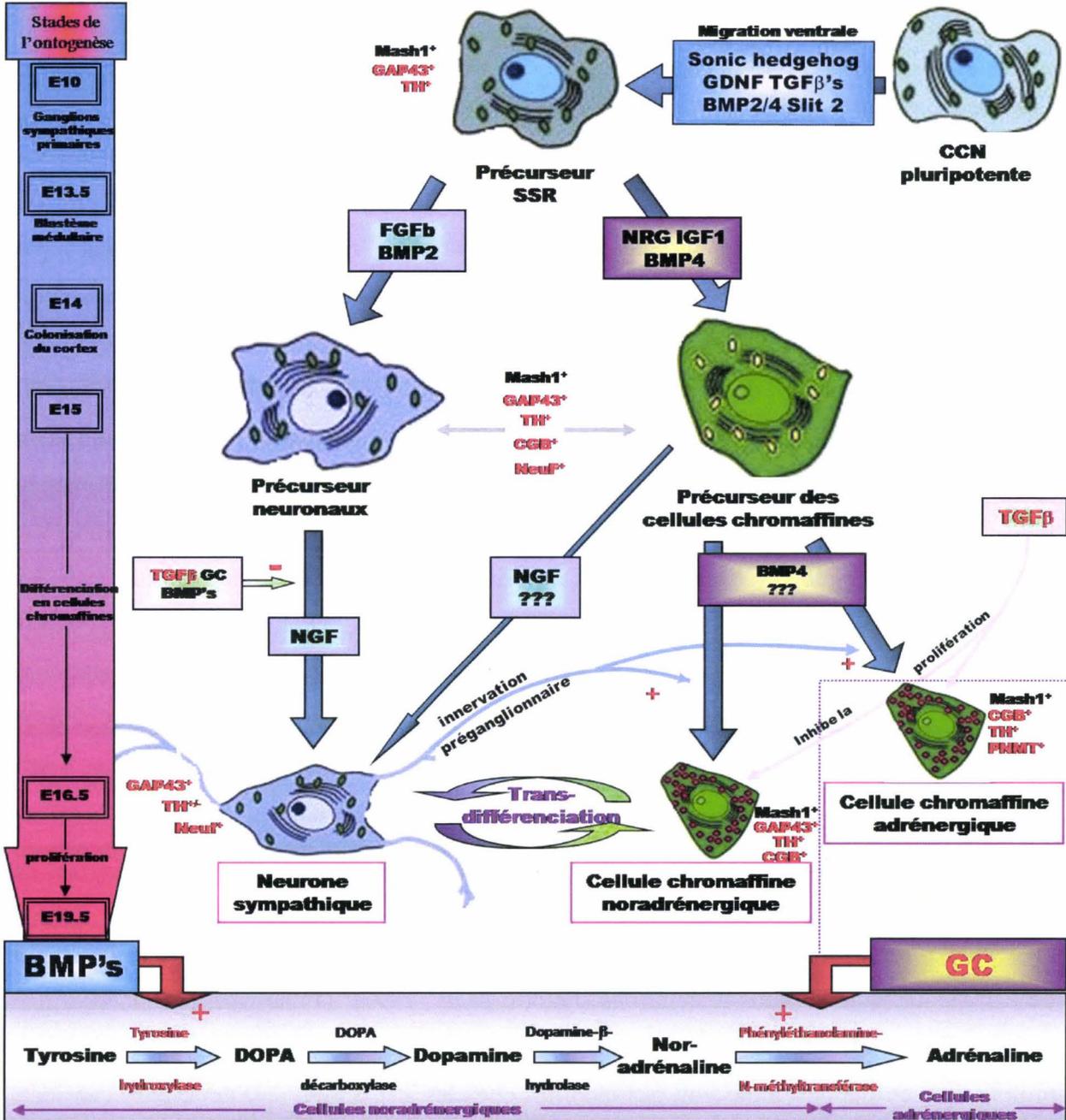


Figure 17: Schéma simplifié de la différenciation des cellules de la lignée sympathosurrénalienne et de la voie de synthèse des catécholamines. Les CCN pluripotentes, sous l'influence de facteurs exprimés par la notocorde (Sonic hedgehog), l'aorte dorsale (BMP2), du microenvironnement (GDNF, Slit 2), migrent et se différencient en cellules formant la lignée SSR (Mash1<sup>+</sup>, TH<sup>+</sup>). Dans la glande surrénale, les voies de signalisation des neurégulines (NRG), de l'IGF1, du BMP4, et l'établissement de l'innervation favorisent la différenciation chromaffine. Au contraire, les voies du bFGF, du BMP2, et du NGF orientent les précurseurs SSR vers une différenciation neuronale. Les deux enzymes limitantes pour la synthèse des catécholamines (TH, PNMT) sont respectivement induites par les BMP' et par les glucocorticoïdes. A l'âge adulte, au moins une sous population des CC NA garde la capacité de se trans-différencier en neurone sympathique post-ganglionnaire. TH: tyrosine hydroxylase ; PNMT : phényléthanolamine-N-méthyl-transférase

*Facteurs du microenvironnement****Glucocorticoïdes et « Nerve Growth Factor »***

Jusqu'à la fin des années 90, il était établi que la différenciation des chromoblastes résultait majoritairement de leur réponse au NGF et aux glucocorticoïdes (Anderson and Axel, 1986). En effet, il était admis que l'environnement de la surrénale riche en glucocorticoïdes permettait exclusivement l'acquisition par la majorité de ces chromoblastes de caractéristiques morphologiques et chimiques spécifiques des CC, en opposition à leur différenciation neuronale en réponse au NGF. En 20 ans, un certain nombre d'études a établi que les glucocorticoïdes exercent des effets sur l'expression de marqueurs de différenciation des CC. Par exemple, les glucocorticoïdes répriment l'expression de protéines neuronales impliquées dans l'exocytose et/ou la plasticité membranaire, telles que le GAP-43 (Federoff *et al.*, 1988), L1 (Grant *et al.*, 1996), les neurofilaments (Vogel and Weston, 1990a; Vogel and Weston, 1990b), ou l'SCG10 (Stein *et al.*, 1988), qui sont spécifiques des CC NA. De façon concordante, le niveau d'expression du GAP-43, de L1 et du SNAP-25 est augmenté dans les CC A suite à la réduction drastique des taux de glucocorticoïdes par hypophysectomie (Langley, données non publiées). A l'inverse, les glucocorticoïdes augmentent la biosynthèse de la chromogranine A (CgA) (Fischer-Colbrie *et al.*, 1989). Le fait que l'action des glucocorticoïdes est inhibée par des antagonistes des GR indique que leurs effets sont spécifiquement médiés par les GR (Michelsohn and Anderson, 1992). Cependant, en 1999, la génération et l'analyse de souris présentant une invalidation génique (KO) du GR par recombinaison homologue a clairement montré que les CC se développent normalement en leur absence, outre la disparition totale de PNMT sur laquelle nous reviendrons (Finotto *et al.*, 1999). D'une part, les glucocorticoïdes ne semblent pas être essentiels pour la croissance des CC, puisque leur nombre ainsi que leur taux de prolifération et d'apoptose ne sont pas modifiés chez les souris GR<sup>-/-</sup>. D'autre part, considérant que ni la morphologie et l'expression de marqueurs de différenciation des CC, tels que le GAP-43, L1 et l'acétylcholine estérase (AChE)<sup>30</sup>, ni l'induction d'un phénotype neuronal par l'administration de NGF ne sont modifiées chez les CC issues d'animaux KO, la signalisation via les GR ne semble pas être restrictive pour la différenciation des CC. En dépit de ces résultats, il est nécessaire de garder à l'esprit que les souris portant une invalidation génique ne représentent aucunement un modèle

---

<sup>30</sup> enzyme impliquée dans l'inactivation de l'acétylcholine et dont l'activité est proportionnelle à la densité des influx nerveux préganglionnaire

physiologique. Ainsi, l'existence de mécanismes de compensation et de redondance communément observés au cours de l'embryogenèse n'exclue donc pas de possibles influences, non restrictives, des glucocorticoïdes sur la différenciation des CC chez les animaux « sauvages ». Quoiqu'il en soit, notre laboratoire a récemment mis en évidence l'expression des récepteurs MR au niveau de la glande surrénale, qui pourraient donc être impliqués dans les effets des glucocorticoïdes autres que l'induction de la PNMT. La question de la fonction des glucocorticoïdes dans le développement des CC reste donc ouverte, cette dernière pouvant être double (Schober *et al.*, 2000) : d'une part, il est clairement établi qu'ils induisent exclusivement l'expression de la PNMT dans 80% des CC et, d'autre part, ils pourraient tout de même participer à prévenir la différenciation neuronale des CC (Doupe *et al.*, 1985a; Doupe *et al.*, 1985b; Seidl and Unsicker, 1989a; Seidl and Unsicker, 1989b; Unsicker *et al.*, 1978), comme le montre, entre autre, l'abolition par les glucocorticoïdes de la croissance de neurites développée par les CC en culture traitées au NGF (Unsicker *et al.*, 1978).

La réponse morphologique des CC au NGF, qui consiste en l'acquisition de pseudo-neurites évoquant une trans-différenciation neuronale, ainsi que la présence de l'ARNm de p75 (récepteur au NGF à faible affinité) dans toutes les CC suggèrent un rôle fondamental du NGF dans leur développement et leur maintenance (Michael and Priestley, 1996). Par ailleurs, la signalisation du NGF fournit un excellent exemple de l'expression différentielle des sous-types de récepteurs aux neurotrophines, puisqu'il a été démontré que contrairement à p75, l'ARNm et la protéine du TrkA (le récepteur au NGF à forte affinité) ne sont retrouvés que dans certaines populations de CC A (Michael and Priestley, 1996; Onso-Cortina *et al.*, 1995). Les gènes décrits à l'origine comme des marqueurs neuronaux, et qui sont réprimés par les glucocorticoïdes, sont, à l'inverse, activés par le NGF. Parmi ceux-ci, on compte le GAP-43 (Federoff *et al.*, 1988), L1 (Grant *et al.*, 1996), SCG10 (Stein *et al.*, 1988), et les NCAM (Poltorak *et al.*, 1990; Poltorak and Freed, 1990). Globalement, le NGF semble donc exercer une influence pro-neuronale sur les chromoblastes, participant ainsi au développement et à la différenciation des neurones sympathiques postganglionnaires intramédullaires.

#### **« *Transforming Growth Factor-β* » et *MASH-1***

Chez le rat, les différentes isoformes du TGF-β sont exprimées à la fois sur le trajet des précurseurs SSR (mur de l'aorte dorsale) et par les cellules corticales (TGF-β2) et chromaffines (TGF-β1 et 3), ce qui semblait indiquer un rôle possible dans la différenciation des CC. Cependant, la neutralisation des trois isoformes du TGF-β à l'aide d'un anticorps dans des embryons de caille a révélé que le TGF-β ne semble pas exercer de fonctions majeures dans la différenciation des CC, puisque les critères morphologiques ainsi que le profil d'expression des principaux marqueurs de

différenciation ne sont pas affectés chez les animaux traités (Combs *et al.*, 2001). Par ailleurs, d'autres membres de la superfamille du TGF- $\beta$  restent toujours des candidats potentiellement impliqués dans la différenciation chromaffine. Par exemple, la lignée cellulaire de phéochromocytome PC12 exprime les récepteurs à l'activine ainsi que le BMP-2B (Paralkar *et al.*, 1992), mais la grande variabilité des effets des différents membres de la superfamille du TGF- $\beta$  entre les différents types cellulaires (Perides *et al.*, 1994) suggère que l'expression des récepteurs aux TGF- $\beta$  est spécifique à chaque type de cellule (Langley and Grant, 1999). Par ailleurs, bien que l'influence du BMP-4 soit requise précocement pour l'induction des précurseurs SSR, il semblerait que la persistance de ce facteur dans l'environnement de ces derniers empêche les stades terminaux de l'acquisition d'un phénotype neuronal (Patzke *et al.*, 2001). Ces observations sont corroborées par l'absence totale de BMP-4 au niveau des ganglions sympathiques ainsi que par son expression par les cellules du cortex surrénalien au cours du développement chez le poussin (Huber, 2006). Ainsi, l'exposition prolongée des précurseurs SSR qui colonisent le cortex surrénalien au BMP-4 pourrait supprimer leur différenciation neuronale terminale, participant ainsi à l'établissement du phénotype chromaffine.

Bien que MASH-1 joue un rôle précoce primordial dans l'induction du phénotype catécholaminergique spécifique de la lignée SSR, la première analyse des souris invalidées pour ce gène ne montrait que de légères modifications de la médullosurrénale, tandis que la population des neurones sympathiques était très largement déficiente (Guillemot *et al.*, 1993). Cependant, Huber et coll. (Huber *et al.*, 2002a) ont ensuite réalisé une étude plus complète chez ces mêmes animaux qui a clairement montré que la majorité des cellules de la médulla n'expriment pas la TH, ne contiennent pas de granules chromaffines, et, globalement, présentent un phénotype neuronal immature. De plus, les auteurs rapportent que chez les animaux mutants, la population de cellules Phox2B positive, qui correspondent aux CC chez les animaux sauvages, est réduite de 60%, parallèlement à une augmentation de l'apoptose dès E16. Ainsi, il apparaît que la différenciation ainsi que le maintien des CC, et plus largement des cellules SSR, sont profondément dépendants des fonctions de MASH-1.

### ***Autres***

Bien que l'expression du PACAP-27 soit restreinte aux CC NA ainsi qu'à certaines fibres sympathiques (Tabarin *et al.*, 1994; Vaudry *et al.*, 2000b), le récepteur de type I au PACAP a été détecté dans les deux types de CC au cours du développement et chez l'adulte (Moller and Sundler, 1996). Ceci suggère un rôle auto- ou paracrine au cours du développement et témoigne, une fois de plus, de la différence des programmes d'expression génique entre les deux sous-populations de CC.

De plus, l'activation de la libération de glucocorticoïdes par le PACAP est exclusivement médiée par la sécrétion des catécholamines par les CC en réponse à ce peptide, puisque l'administration d'un antagoniste catécholaminergique inhibe la libération de glucocorticoïdes (Hamelink *et al.*, 2002). Ainsi, la signalisation du PACAP pourrait intervenir non seulement dans la différenciation des CC, mais également dans les interactions entre les cellules du cortex et de la médulla qui participent à l'homéostasie de la glande surrénale dans son ensemble.

Le GDNF est lui aussi exprimé dans la glande surrénale en développement chez le rat et la souris, et son récepteur GFRalpha-3 a également été observé dans les CC chez la souris (Buj-Bello *et al.*, 1995; Trupp *et al.*, 1995). Plus précisément, le GDNF a été identifié dans les précurseurs des CC ainsi que dans la majorité des CC A et NA, son niveau d'expression augmentant avec l'âge (Krieglstein *et al.*, 1996). Ainsi, ce facteur de croissance pourrait intervenir dans la régulation de la différenciation des CC.

L'influence de l'IGF-I, qui, comme nous le verrons par la suite, est primordiale pour la prolifération des CC, semble aussi intervenir dans la différenciation des CC. En effet, il a été montré que l'administration d'IGF-I dans une culture de CC bovines augmente l'expression et l'activité de la TH et, conséquemment, de la DBH et de la PNMT (Hwang and Choi, 1995). Par ailleurs, l'IGF-I est aussi capable d'augmenter la synthèse et le contenu en peptides dérivés de la pro-enképhaline dans les granules chromaffines chez le bovin (Wilson, 1991). L'ensemble de ces données suggère donc que l'IGF-I pourrait influencer la différenciation des CC.

#### *Différenciation adrénérgique : glucocorticoïdes et PNMT*

Les glucocorticoïdes présents chez le fœtus dès E16 sont nécessaires à l'expression de la phényléthanolamine-N-méthyl-transférase (PNMT) par les CC A, qui possèdent le récepteur (Finotto *et al.*, 1999). En effet, chez les souris invalidées pour le GR, les CC de la médullosurrénale présentent une absence totale d'expression de la PNMT, bien qu'elles semblent se développer normalement (Unsicker *et al.*, 1997).

Puisque les glucocorticoïdes régulent l'expression d'un grand nombre de gènes chez certaines CC, il semble alors nécessaire que des sous-populations de chromoblastes, qui possèdent un profil différent de sensibilité aux glucocorticoïdes et/ou aux différents facteurs de croissance, soient présentes au sein du blastème sympathique extra-surrénalien avant la migration dans le primordium cortical. Ces sous-populations seraient à l'origine des deux types différents de CC de la médullosurrénale (Cole *et al.*, 1995). Dans ce sens, les GR sont exprimés par les CC NA à des

niveaux bien inférieurs à ceux retrouvés dans les CC A, ce récepteur étant nécessaire à la transcription de la PNMT chez les mammifères (Ceccatelli *et al.*, 1989; Ebert *et al.*, 1994). Les mécanismes qui sous-tendent l'expression différentielle des GR restent cependant inconnus à l'heure actuelle. Les régulateurs positifs et négatifs des différents constituants spécifiques aux deux populations de CC doivent eux-mêmes être exprimés de façon différentielle (Langley and Grant, 1999). Quoi qu'il en soit, la morphologie des clusters de chromoblastes en différenciation au cours du développement périnatal suggère une influence de la concentration locale en facteurs environnementaux. En effet, il a été observé qu'au sein de ces clusters, les cellules périphériques ont majoritairement tendance à adopter un phénotype A, en considérant le niveau de TH et PNMT, tandis que les cellules localisées à l'intérieur des groupements conservent des caractéristiques, entre autre neuronales, plus typiques des CC NA (Leon *et al.*, 1992a).

Indépendamment de l'implication de facteurs de l'environnement et de l'innervation cholinergique (Evinger *et al.*, 1994), Langley et Grant suggèrent que l'expression de la PNMT doit être sous la dépendance de composants génétiques intrinsèques (Langley and Grant, 1999), considérant que les niveaux d'expression du messenger et de la protéine varient entre les différentes lignées de rat (Evinger and Joh, 1989), et que la PNMT n'est pas sous le contrôle des glucocorticoïdes chez les oiseaux et les amphibiens (Wurtman *et al.*, 1968).

#### *Synthèse des catécholamines*

L'appartenance des CC à l'un des deux phénotypes, A et NA, dépend de l'expression restrictive des enzymes clés de la synthèse des catécholamines : la TH et la phényléthanolamine-N-méthyl-transférase (PNMT). Comme on peut le voir sur la figure 18, l'hydroxylation de l'acide aminé précurseur des catécholamines, la tyrosine, par la TH constitue le premier stade limitant dans la chaîne de synthèse des catécholamines (Ernsberger *et al.*, 1995). Elle résulte en la formation de NA suite à l'action successive de la DOPA-décarboxylase et de la dopamine- $\beta$ -hydrolase (DBH), dont l'activité n'est pas restrictive. L'expression de la TH étant induite précocement par les BMP dans tous les précurseurs SSR, ces derniers présentent donc un phénotype NA, qui, comme nous l'avons vu précédemment, représente une des caractéristiques majeures de la lignée SSR. Ainsi, les chromoblastes qui s'agrègent au niveau du blastème médullaire sont tous NA. C'est à ce niveau que les fortes concentrations en glucocorticoïdes vont pouvoir induire l'expression de la PNMT qui constitue le deuxième stade limitant dans la synthèse des catécholamines, permettant ainsi la méthylation finale de la NA en A. Cette induction n'étant efficace que dans 80% des chromoblastes, il existe donc deux populations distinctes de CC : une minorité qui, ne subissant pas l'influence des

glucocorticoïdes, conserve un phénotype NA ; et une majorité qui, se mettant à exprimer la PNMT, va acquérir un phénotype A. Ainsi, tandis que la TH permettra l'identification de la population chromaffines totale de la médullosurrénale, la PNMT, étant exprimée de façon différentielle par ces deux phénotypes, constitue quant à elle le marqueur de choix pour les distinguer.

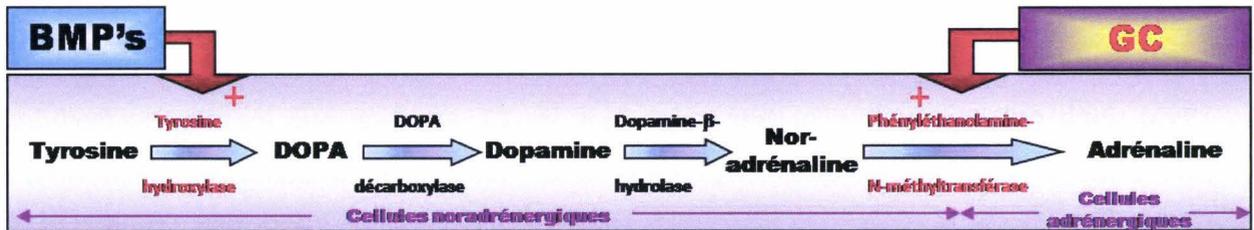


Figure 18 : Synthèse des catécholamines

#### Intérêts des marqueurs moléculaires

Toutefois, il apparaît que bien d'autres molécules, qu'elles soient sécrétées ou structurales, sont exprimées spécifiquement ou à des taux drastiquement différents par les CC de phénotype A ou NA. Cette expression différentielle a permis, au fur et à mesure de l'avancée des techniques d'immunohistochimie et de l'augmentation des batteries d'anticorps disponibles, d'affiner l'observation et la compréhension des différentes étapes et processus qui accompagnent la différenciation des CC.

Parmi les peptides fortement enrichis dans les granules de sécrétion NA se trouvent le pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) (Tabarin *et al.*, 1994; Vaudry *et al.*, 2000b), le FGF basic (Bieger *et al.*, 1995; Grothe and Unsicker, 1989; Grothe and Unsicker, 1990), le NPY, la bombésine et la dynorphine (Dumont *et al.*, 1983; Lemaire *et al.*, 1986; Majane *et al.*, 1985). Cependant, malgré un grand nombre de données chez le rat, la souris, le chat, le cobaye et l'homme quant au NPY, quelques publications ont tout de même décrit une faible expression de ce neuropeptide dans les CC A (Dorsey and Schmidt, 1993) ainsi que sa co-expression avec l'Enk, plus spécifique des CC A, chez toutes les espèces sauf le cochon (Lundberg *et al.*, 1986). Par ailleurs, il semblerait que certains peptides, tels que la neurotensine (Terenghi *et al.*, 1983), ne sont exprimés que par des sous-populations de CC NA, ce qui suggère l'existence d'une certaine hétérogénéité dans la composition des granules de sécrétion au sein de cette population de CC. Les CC NA expriment aussi spécifiquement des protéines de structure plus caractéristiques d'un phénotype neuronal et

impliquées dans l'exocytose et/ou la plasticité membranaire et/ou l'adhésion, ce qui témoigne de différences intrinsèques dans les mécanismes de sécrétion des CC A et NA. Parmi celles-ci se trouvent le GAP-43 (Federoff *et al.*, 1988), une molécule d'adhésion cellulaire de la famille des immunoglobulines, L1 (Grant *et al.*, 1996), les neurofilaments (Vogel and Weston, 1990b), et la « Superior Cervical Ganglia neural-specific 10 protein » ou SCG10 (Stein *et al.*, 1988).

Par contraste, le facteur natriurétique atrial (ANF) (McKenzie *et al.*, 1985; Mukoyama *et al.*, 1988), le « calcitonin gene related peptide » (Kuramoto *et al.*, 1987), ainsi que la rénine (Berka *et al.*, 1996) semblent majoritairement exprimées dans les CC A. Bien que les Leu- et méthionine-Enk (Met-Enk) aient été identifiées dans les granules A, avec une expression très occasionnelle dans les CC NA chez le rat, le mouton, le bœuf, et le cochon (Dumont *et al.*, 1983; Pelto-Huikko *et al.*, 1985; Roisin *et al.*, 1983; Wan *et al.*, 1989a; Wan *et al.*, 1989b), il a été décrit par la suite que la Met-Enk est principalement stockée dans les granules NA (Tran *et al.*, 1993). Chez l'homme, il semblerait qu'une telle ségrégation ne soit pas aussi évidente, avec une grande variabilité dans la répartition des granules au sein des différentes populations de CC (Hervonen *et al.*, 1989). De façon générale, la régulation de l'expression des Enk dans la médullosurrénale est très complexe, et semble découplée de celle des autres peptides (Wikstrom *et al.*, 1996), comprenant une répression par l'innervation sympathique (Bohn *et al.*, 1983). Il est à noter aussi que le récepteur à l'insuline est majoritairement confiné aux CC A (Serck-Hanssen and Sovik, 1987).

### *I.C.3.2. Agrégation et prolifération des cellules chromaffines*

#### *Morphologie et molécules d'adhésion*

Bien que les mécanismes moléculaires qui déterminent l'expression des molécules d'adhésion dans les cellules SSR restent largement méconnus, Léon et coll. ont suggéré que l'expression différentielle de ces molécules entre les CC A et NA détermine l'architecture de la glande médullosurrénale (Leon *et al.*, 1992b; Leon *et al.*, 1992a). En effet, la co-expression des NCAM et de L1 par les CC NA augmenterait leurs interactions cohésives, les faisant se séparer des CC A, qui n'expriment que les NCAM, et induisant la ségrégation des CC en groupe homophénotypiques. Ce mécanisme, décrit chez les mammifères, pourrait être à l'origine de l'innervation différentielle des deux types de CC, ce qui constitue une condition nécessaire pour l'acquisition de leurs rôles fonctionnels respectifs (Langley and Grant, 1999).

De plus, l'expression d'un certain nombre de protéines impliquées dans la plasticité membranaire ainsi que dans le cytosquelette diffère entre les CC A et NA. Par exemple, le GAP-43,

qui est impliqué dans la formation du cône de croissance de l'axone (Oestreicher *et al.*, 1997), dans la motilité cellulaire (Frey *et al.*, 2000), ainsi que dans la transduction de signaux extracellulaires (Huang *et al.*, 2003), est conservé uniquement par les CC NA (Grant *et al.*, 1994). De la même façon, le Neuf 3, qui intervient classiquement dans le cytosquelette axonal (Sihag *et al.*, 2007), est réprimé chez les CC au cours de leur différenciation A (Schober *et al.*, 2000). Ainsi, il semblerait que l'expression combinée et spécifique de molécules d'adhésion et de plasticité membranaire par les CC NA aboutisse, à terme, à la ségrégation des CC en groupes homophénotypiques.

#### *Prolifération et croissance des cellules chromaffines*

Au cours du développement précoce, le nombre de CC augmente au fur et à mesure qu'elles s'associent pour former une structure médullaire compacte au centre de la glande surrénale (de E16,5 à P7). Bien que la population chromaffine continue de croître parallèlement aux besoins de l'organisme pour atteindre progressivement sa masse adulte, les capacités d'incorporation du bromo-desoxy-uridine (BrdU) diminuent au fur et à mesure de la croissance postnatale (Froding and Gammeltoft, 1994). La prolifération des CC semble être contrôlée par les interactions spécifiques et complexes de signaux nutritionnels, hormonaux, et neurogéniques, dont la plupart n'a été identifiée qu'*in vitro* (Tischler *et al.*, 1989). En effet, des facteurs nutritionnels, tels que le glucose, le lactose, le calcium, et la vitamine D3 semblent influencer la prolifération des CC (Tischler *et al.*, 1996). Parallèlement, certains facteurs de croissance, incluant le NGF, le FGF2, et l'IGF-II, stimulent la prolifération ainsi que la survie des CC (Schober *et al.*, 2000). A l'inverse, il a été rapporté que les glucocorticoïdes, le PACAP, et le TGF- $\beta$ 2, sont des inhibiteurs de la prolifération des CC (Combs *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2002b; Vaudry *et al.*, 2000b). Cependant, l'inactivation par recombinaison homologue du gène du récepteur GR aux glucocorticoïdes a permis de montrer que la signalisation via les GR n'influçait pas la prolifération CC de façon notable, puisque chez ces animaux, la prolifération et le nombre de CC ne sont pas affectés (Finotto *et al.*, 1999).

L'influence stimulatrice des IGF, du FGFb ainsi que du NGF sur la prolifération des CC semble être primordiale au cours de leur développement. L'étude réalisée *in vitro* par Froding and Gammeltoft (Froding and Gammeltoft, 1994) sur des CC prélevées sur des rats à différents stades du développement a permis de montrer les effets individuels et combinés de ces différents facteurs de croissance. L'administration d'IGF-I ou -II (10nM) durant 6 jours augmente le nombre de CC fœtales, néonatales, et adulte en prolifération (BrdU positives) de 50, 20, et 2% respectivement. Des effets comparables sont observés chez les CC néonatales et adultes après adjonction de 1nM de FGFb ou de 2 nM de NGF. De façon très intéressante, la combinaison de l'un des deux IGF avec l'un ou

l'autre de ces facteurs provoque une augmentation de la prolifération supérieure à l'addition de leurs actions individuelles, ce qui indique qu'ils agissent en synergie pour activer la prolifération des CC. De plus, cette action synergique des IGF et du NGF ou FGFb, qui n'est que d'un facteur deux ou quatre chez les CC postnatales, atteint un rapport de dix à vingt chez les CC adultes. De ce fait, il semblerait que la stimulation de la prolifération des CC soit séquentielle : d'une part, ces différents facteurs favoriseraient la prolifération des CC de façon relativement indépendante, avec une prédominance de l'influence des IGF en période prénatale ; d'autre part, les IGF-I et -II agiraient en synergie avec le FGFb et le NGF pour promouvoir le maintien de la population chromaffine chez l'organisme mature. Afin de conclure sur ce sujet, il a récemment été démontré que la déhydroépiandrostérone (DHEA) entraîne une réduction de moitié de la prolifération des CC induite par l'IGF-II (Sicard *et al.*, 2006). Cette hormone, produite par la couche interne du cortex (zone réticulée), interviendrait donc dans la régulation de la croissance des CC par le cortex surrénalien, et ce en modulant les effets prolifératifs de l'IGF-II.

Bien qu'un certain nombre d'études réalisées *in vitro* ait suggéré que le TGF- $\beta$  puisse être un des facteurs impliqués dans l'inhibition de la prolifération des CC au cours du développement, ses rôles ont toujours été sujets à controverse. Les trois isoformes du TGF- $\beta$  ont été identifiées dans la glande surrénale (Anderson, 1993b), et, chez le rat, les cellules corticales expriment exclusivement le TGF- $\beta$ 2, tandis que les CC possèdent les ARNm codant le TGF- $\beta$ 1 et 3 ainsi que les trois isoformes du récepteur (Langley and Grant, 1999). En 2000, la neutralisation des trois isoformes du TGF- $\beta$  chez le poussin à l'aide d'un anticorps neutralisant non spécifique a permis de montrer, *in vivo*, son influence inhibitrice, ces animaux présentant une augmentation du nombre de CC (Combs *et al.*, 2001). L'étude plus récente des animaux KO pour le TGF- $\beta$ 1, 2, et 3 a permis de montrer l'influence majeure du TGF- $\beta$ 2 sur la prolifération des CC (Rahhal *et al.*, 2004). En effet, les animaux portant une invalidation génique du TGF- $\beta$ 2 présentent une forte augmentation du nombre de CC, sans modification de leur différenciation, tandis que les CC ne semblent pas être affectées chez les souris invalidées pour les autres isoformes du TGF- $\beta$ . L'influence du PACAP sur la prolifération des CC reste quant à elle ambivalente (Vaudry *et al.*, 2000b). En effet, il a été montré, d'une part, que le PACAP stimule la prolifération des CC maintenues en culture primaire et, d'autre part, qu'il inhibe la prolifération des CC induite par le NGF (Frodin *et al.*, 1995; Tischler *et al.*, 1995). De plus, le PACAP provoque l'arrêt de la croissance des cellules PC12 en culture, tout en induisant leur différenciation à la fois neuronale et neuroendocrine (Grumolato *et al.*, 2003b; Onoue *et al.*, 2001). L'étude de la glande médullosurrénale des animaux KO pour le PACAP, qui, à notre connaissance,

n'a toujours pas été réalisée, devrait permettre de mieux comprendre l'influence de ce neuropeptide sur le développement des CC.

L'apoptose, qui correspond à une mort cellulaire programmée, est un mécanisme fortement impliqué dans la régulation du développement des populations cellulaires au cours de l'embryogenèse et de l'organogenèse. Cette « autodestruction » est réalisée en grande partie par une famille de protéases à cystéines, les caspases, qui vont initier et accomplir un grand nombre de modifications du métabolisme cellulaire (Fan *et al.*, 2005). Parmi celles-ci, on compte la fragmentation de l'ADN nucléaire, la perforation des membranes cellulaires, ainsi que la destruction d'un certain nombre de protéines. Au sein de la cascade enzymatique des caspases, la caspase-3 joue un rôle prépondérant, notamment en fragmentant l'ADN nucléaire (Porter and Janicke, 1999). Néanmoins, la mort cellulaire programmée existe également sous une forme indépendante des caspases, qui repose sur le facteur d'induction de l'apoptose (AIF) (Lorenzo *et al.*, 1999; Susin *et al.*, 2000). La détection des cellules en apoptose repose alors à la fois sur la mise en évidence des modifications cellulaires observées au cours des différentes phases de l'apoptose, comme la fragmentation de l'ADN, et également sur l'évaluation de l'activité des acteurs moléculaires potentiellement impliqués, tels que la caspase-3. De façon intéressante, il a également été montré que le PACAP (Vaudry *et al.*, 2000b), les IGF-I et -II, le bFGF et le NGF (Frodin and Gammeltoft, 1994) stimulent la survie des CC.

### *I.C.3.3. Influences de l'innervation*

#### *Innervation préganglionnaire*

L'innervation de la médullosurrénale, qui est initiée en période postnatale et semble être totalement fonctionnelle au cours de la 2<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale, pourrait moduler le sous-type neurochimique des CC et des neurones sympathiques ganglionnaires matures de la glande (Henion and Landis, 1990). Dans ce sens, bien que l'ensemble des facteurs évoqués ci-dessus concoure à la différenciation des CC, leur influence semble être modulée par la stimulation électrique, suggérant ainsi un rôle potentiel de régulation par l'innervation des CC (Langley and Grant, 1999). En effet, une dépolarisation provoquée par l'adjonction de potassium à des CC bovines en culture primaire ou à des cellules PC12 en culture, qui mime une stimulation nerveuse, suffit à modifier l'expression d'un certain nombre de protéines, telles que la TH, la PNMT, le NPY, l'Enk, la galanine, et la sécrétogranine-II (Fischer-Colbrie *et al.*, 1989; Higuchi *et al.*, 1996; Kilbourne *et al.*, 1991; La Gamma and Black, 1989; MacArthur *et al.*, 1993; Menezes *et al.*, 1996; Nagamoto-Combs *et al.*, 1997; Rokaeus *et al.*, 1990; Stachowiak *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1991). De même, des changements

immédiats dans la transcription de gènes en réponse à une dépolarisation membranaire ont été étudiés dans ces cellules (Bartel *et al.*, 1989). En considérant qu'une activation électrique des CC combinée à diverses cytokines entraîne des modifications dans la régulation de protéines de la lignée SSR (Fann and Patterson, 1994), il semble exister au sein des cellules SSR une régulation fine, entre autre nerveuse, de l'expression des gènes spécifiques à ces cellules (Langley and Grant, 1999).

L'influence de l'innervation peut également être en partie réalisée par la libération de facteurs trophiques, tels que le PACAP (Wolf and Krieglstein, 1995; Yon *et al.*, 1998a), qui n'est retrouvé que dans une sous-population des fibres sympathiques innervant la médulla (Tabarin *et al.*, 1994; Vaudry *et al.*, 2000b). Quoi qu'il en soit, l'activation des fibres splanchniques innervant la médulla semble pouvoir s'opérer spécifiquement sur les différents faisceaux innervant séparément les CC A ou NA (Marley and Livett, 1987). De plus, il a été montré que les récepteurs aux neurotransmetteurs et neuromodulateurs présentent une distribution différente entre les CC A et NA, tant au niveau qualitatif que quantitatif. Cette distribution varierait de plus selon les espèces. Chez le chat, la stimulation des récepteurs muscariniques à l'ACh induit une libération préférentielle d'A (Ballesta *et al.*, 1989). Chez les espèces bovines, bien qu'il ait été rapporté que les récepteurs muscariniques n'interviennent pas dans l'activité sécrétrice des CC, les CC NA présentent une densité de ces récepteurs deux à trois fois supérieure à celle retrouvée dans les CC A (Michelena *et al.*, 1991). A l'inverse, les récepteurs nicotiques, dont l'activation aboutit à l'exocytose des catécholamines, sont plus abondants dans les CC A chez le bovin (Nunez *et al.*, 1995). Parallèlement, d'autres récepteurs membranaires seraient également exprimés de façon différentielle entre les CC. Ainsi, la réponse évoquée par la bradykinine et l'ATP est plus importante dans les CC NA chez le bovin, tandis que l'angiotensine-II et l'histamine semblent plus efficaces sur les CC A (Nunez *et al.*, 1995). Il semblerait donc que la spécificité des fibres préganglionnaires projetant sur certaines populations de CC ainsi que l'expression différentielle des récepteurs aux neurotransmetteurs par ces dernières soient à l'origine du contrôle différentiel des phénotypes chromaffines.

#### *Développement et maintien des neurones préganglionnaires*

Comme pour la majorité des populations neuronales, il a été suggéré que la croissance et le maintien des neurones préganglionnaires sympathiques qui innervent la médullosurrénale, situés dans la colonne intermédiaire-latérale de la moelle épinière, dépendent en partie de facteurs sécrétés au niveau de leur cible. Par exemple, l'étude d'animaux KO pour le récepteur TrkA au NGF a permis de montrer non seulement une réduction du nombre de neurones innervant la médullosurrénale, mais également une diminution de leur activité acétylcholine transférase (Schober *et al.*, 1997). De la

même façon, la neurotensine (NT) 4 synthétisée par les CC joue un rôle majeur dans le développement et la survie des neurones sympathiques qui projettent vers la médulla, ces derniers exprimant le récepteur TrkB à la NT-4 et au BDNF. En effet, d'une part, les souris portant une invalidation de la NT-4 présentent une diminution du nombre de neurones de la colonne intermédio-latérale (Th7 à Th10), et d'autre part, la complémentation en NT-4 chez des animaux surrénalectomisés prévient complètement la dégénérescence de ces neurones (Schober 98). Il a également été montré que le FGFb (Blottner *et al.*, 1989), le « Ciliary Neurotrophic Factor » (CNTF) (Blottner and Unsicker, 1989), les TGF- $\beta$  (Blottner *et al.*, 1996), et le GDNF (Schober *et al.*, 1997) exercent des effets similaires après une telle ablation.

#### *Existence de neurones sympathiques intramédullaires*

Enfin, deux grands types de cellules sont présents dans la surrénale à E16 : les précurseurs des CC qui possèdent des caractéristiques neuroendocrines et de rares cellules qui s'associent en îlots et possèdent les caractéristiques des sympathoblastes (précurseurs embryonnaires des neurones sympathiques). Ces cellules prédifférenciées sont à l'origine des îlots de neurones intramédullaires. Deux phénotypes neuronaux, les neurones ganglionnaires de type I et de type II, ont été identifiés dans la glande surrénale chez le rat (Holgert *et al.*, 1996). La majorité des neurones intra-médullaires sont NA, et aucune activité acétylcholine transférase n'est détectée dans la médulla, indiquant l'absence de neurones cholinergiques (Dagerlind *et al.*, 1990). De plus, il pourrait exister des populations très minoritaires de neurones qui présenteraient des caractéristiques non-adrénergiques et non-cholinergiques (Holgert *et al.*, 1996). Le nombre de neurones intramédullaires augmente fortement au cours de la gestation et ils s'associent en îlots (~30/îlot) au centre de la médullosurrénale. L'établissement de contacts intercellulaires et la libération de facteurs trophiques (NGF, BMP2, FGFb) participent à la prolifération et/ou à la différenciation des sympathoblastes. Cependant, après la naissance (P15), les îlots de neurones sont très rares et le nombre de neurones par îlot est très réduit. Il semblerait qu'une mort neuronale, plutôt qu'une éventuelle différenciation aboutissant à un phénotype neuroendocrinien, soit à l'origine de cette disparition.

#### I.C.4. Fonctions du système sympathosurrénalien

Avant de détailler les effets de la dénutrition maternelle périnatale de 50% sur la physiologie de la glande médullosurrénale, et plus largement du système SSR, chez la descendance à l'âge adulte, il est nécessaire de se remémorer les principales fonctions homéostatiques du système SSR dans l'organisme mature.

De façon générale, il est possible de résumer les fonctions du système SSR au sein de l'organisme comme une entité de défense et d'adaptation physiologique au stress, ce qui fut présumé par Canon lorsqu'il émit la notion de « fight or flight » au quart du siècle dernier (1929)<sup>31</sup>. En effet, le système SSR possède un large spectre d'action sur les différents organes, de par la dispersion des fibres sympathiques dans le corps (figure 12) ainsi que de par l'expression des différents sous-types de récepteurs catécholaminergiques par un grand nombre de types cellulaires disséminés dans différents organes (tableau 4). Ce large spectre, qui confère au système SSR une place primordiale dans la régulation de l'homéostasie à l'état basal, est particulièrement mobilisé face à un stress, réalisant ainsi de nombreux réajustements fonctionnels visant à adapter, de la façon la plus adéquate possible, l'homéostasie de l'organisme au défi suscité par le stress (« fight or flight »). Globalement, l'activité du système SSR va permettre : premièrement, des adaptations du métabolisme énergétique permettant le maintien de la glycémie en conditions hypoglycémiques (ce qui constitue, *per se*, un stress), ainsi que l'augmentation de cette dernière en conditions de stress (notamment pour préparer à l'activité physique) ; deuxièmement, des adaptations du métabolisme cardiovasculaire visant à préparer l'organisme à faire face au stress, principalement via un accroissement du débit cardiaque et de la pression artérielle, ainsi qu'une redistribution de l'afflux sanguin vers le cœur, le cerveau, et le tissu musculaire.

---

<sup>31</sup> Notons que Canon a identifié le système nerveux autonome (sympathique et parasympathique) en poursuivant ses recherches sur la notion d'homéostasie

Type de récepteur	Localisation	Effets de la liaison
$\beta 1$	Cœur	Accroissement de la fréquence (effet chronotrope) et de la force de contraction cardiaque (effet inotrope)
	Reins	Déclenchement de la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires
$\beta 2$	Pancréas (cellules $\beta$ )	Déclenchement de la sécrétion d'insuline
	Vaisseaux sanguins desservant le cœur Plupart des organes cibles du SNS	Vasodilatation Effets principalement inhibiteurs : dilatation des bronchioles, relâchement des muscles lisses de la paroi du tube digestif et du tractus urinaire, relâchement de la paroi de l'utérus chez la femme enceinte
$\beta 3$	Tissus adipeux	Déclenchement de la lipolyse par les adipocytes (effet métabotrope)
$\alpha 1$	Vaisseaux sanguins desservant la peau, les muqueuses, les organes abdominaux, les reins, et des glandes salivaires Plupart des organes cibles du SNS à l'exception du cœur	Vasoconstriction Constriction des sphincters des viscères, dilatation de la pupille
	Pancréas (cellules $\alpha$ )	Inhibition de la sécrétion de glucagon
$\alpha 2$	Membrane des corpuscules nerveux terminaux des fibres adrénergiques	Modulation de l'inhibition de la libération de NA par les terminaisons adrénergiques
	Pancréas Membrane plasmique des plaquettes sanguines	Inhibition de la sécrétion d'insuline Facilitation de la coagulation sanguine

Adapté de « Anatomie et physiologie humaines, E.N. Marieb, DeBoeck Université

Tableau 4 : Localisation et principales fonctions des différents sous-types de récepteurs adrénergiques et noradrénergiques.

#### I.C.4.1. Régulation du métabolisme énergétique et de la glycémie

Ainsi, le système SSR va participer au maintien de la glycémie en intervenant à différents niveaux de sa régulation.

##### Effets sur la sécrétion d'insuline

Les effets des catécholamines sur la sécrétion d'insuline, bien que globalement inhibiteurs, semblent dépendre du sous-type de récepteur activé. En effet, l'activité physiologique majeure des catécholamines est d'inhiber la sécrétion d'insuline en réponse au glucose via l'activation des récepteurs  $\alpha 2$ , présents sur les cellules  $\beta$  du pancréas, et ce au travers de l'inhibition de la voie ERK1/2, et de la réduction de l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire induite par le glucose (Gibson *et al.*, 2006; Hirose *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 1982; Zawalich *et al.*, 2007). Cette inhibition de la sécrétion d'insuline participerait alors à l'augmentation de la glycémie induite par les catécholamines en réponse au stress. Par ailleurs, il a été montré que des agonistes  $\beta$ -adrénergiques potentialisent la réponse des cellules  $\beta$  au glucose (Marcal *et al.*, 2006), ce qui pourrait représenter un mécanisme de rétrocontrôle des catécholamines sur leur action inhibitrice, et éventuellement participer à la régulation de l'hyperglycémie. De plus, la dopamine semble stimuler les effets du glucose sur la sécrétion d'insuline à faible concentration, et qu'au contraire, elle l'inhibe à forte concentration via l'activation des récepteurs D2 (Shankar *et al.*, 2006).

Parallèlement, les effets stimulateurs de la dopamine sont inhibés par la NA, ce qui suggère un rôle de la dopamine ainsi que des interactions entre les différentes catécholamines dans la régulation de la sécrétion d'insuline.

#### *Glycogénolyse et néoglucogenèse hépatique*

En plus de leurs effets inhibiteurs sur la sécrétion d'insuline, les catécholamines stimulent la libération de glucose dans le sang par les cellules hépatiques (Yamazaki *et al.*, 1982), et ce par deux mécanismes. D'une part, elles stimulent la libération de glucagon par les cellules  $\alpha$  pancréatiques (Taborsky, Jr. *et al.*, 1998), et d'autre part, elles stimulent directement la libération de glucose par les hépatocytes en activant les enzymes de la néoglucogenèse (Ahren, 2000; Bolli and Fanelli, 1999). A ce propos, des expériences de périfusion euglycémique ont pu montrer que l'A potentialise les effets stimulateurs du glucagon sur la néoglucogenèse, tandis qu'elle aurait une tendance à réduire la stimulation de la glycogénolyse par le glucagon (Gustavson *et al.*, 2003b). Quoi qu'il en soit, il semblerait également que les effets glycogénolytiques et néoglucogéniques de ces deux hormones puissent être additifs pour augmenter la quantité finale de glucose libéré (Gustavson *et al.*, 2003a). Toutefois, les souris KO pour la dopamine beta hydroxylase, une des enzymes initiales de la chaîne de synthèse des catécholamines (figure 18), bien qu'hyperglycémiques chroniques, ne semblent pas présenter de modification de la glycogénolyse en réponse au jeûne, ni de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Les auteurs concluent que cette invalidation entraîne une réinitialisation du niveau basal de la glycémie, ainsi que la mise en place de mécanismes compensatoires de contrôle de la glycogénolyse (Ste Marie and Palmiter, 2003). Ainsi, les catécholamines agissent sur la glycémie à la fois de façon directe, en stimulant la néoglucogenèse, et indirecte, en stimulant la libération de glucagon et en inhibant la sécrétion d'insuline.

#### *Métabolisme musculaire*

Les catécholamines exercent également des influences sur le métabolisme musculaire. En effet, les niveaux élevés d'A plasmatique au cours d'un exercice modéré chez des adultes non entraînés augmentent la mobilisation du glycogène musculaire et l'activation de la pyruvate déshydrogénase, ce qui résulte en un accroissement de l'oxydation des glucides (Watt *et al.*, 2001). Cet accroissement de la glycogénolyse musculaire serait vraisemblablement dû à une activation de la glycogène-phosphorylase. Par ailleurs, les auteurs rapportent également une réduction de la capture du glucose, qu'ils attribuent indirectement à l'augmentation de la concentration intracellulaire en glucose-6-phosphate, liée à l'intensification de la glycogénolyse,

et la réduction de la phosphorylation du glucose qui en découle. Par la suite, Watt et Hargreaves (Watt and Hargreaves, 2002) ont montré la persistance de cette réduction de la capture du glucose chez des sujets humains ayant suivi un protocole d'épuisement du glycogène musculaire, grossièrement comparable aux préconisations du régime dissocié scandinave, de façon préalable à l'enregistrement, ce qui prévient toute augmentation massive du glucose musculaire intracellulaire. Ainsi, en plus de leur influence glycogénolytique, les catécholamines exerceraient un effet inhibiteur direct sur le transport sarcoplasmique du glucose, ce qui pourrait, une fois de plus, participer au maintien de la glycémie. Dans ce sens, les catécholamines sont également capables de stimuler la lipolyse au niveau des cellules musculaires, favorisant ainsi l'économie du glucose périphérique (Qvisth *et al.*, 2006).

#### *Lipolyse*

Le catabolisme des lipides, ou lipolyse, est principalement réalisé par la lipase hormono-sensible (Londos *et al.*, 1996) dont l'activité dans les adipocytes est régulée par le taux d'AMP cyclique intracellulaire, lui-même modulé par un certain nombre d'hormones, telles que les catécholamines, l'ACTH, et l'insuline chez le rat (Holm *et al.*, 2000), ou les catécholamines, l'insuline, et l'ANF chez l'homme (Arner, 2005). Au niveau des adipocytes, la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques produit une stimulation de la lipolyse, via la phosphorylation de la lipase hormono-sensible (Londos *et al.*, 1996) et de la périlipine A (protéine qui tapisse les gouttelettes lipidiques et qui restreint leur accès à l'état déphosphorylé) (Tansey *et al.*, 2004). De plus, le système SSR semble être mobilisé par d'autres systèmes de régulation de la lipolyse. Par exemple, la stimulation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux blanc et de la thermogénèse au niveau du tissu adipeux brun par un agoniste non sélectif des récepteurs aux mélanocortines (Raposinho *et al.*, 2003) est réalisée par une activation sympathique au niveau central (Brito *et al.*, 2007). Les auteurs notent que cette activation semble être spécifique du système sympathique et ne pas affecter la médullosurrénale. Il en ressort que le système SSR intervient doublement dans la régulation de la lipolyse, d'une part de façon endocrine et basale par les catécholamines circulantes, et, d'autre part, de façon nerveuse et dynamique par l'activation du SNS.

#### *I.C.4.2. Régulation du métabolisme cardiovasculaire*

##### *Activité cardiaque*

Le système sympathique et les catécholamines exercent des fonctions inotropes (augmentation de la force de contraction) et chronotropes (augmentation du rythme) sur l'activité cardiaque. L'A plasmatique est requise pour la réponse normale de la pression sanguine et du

remplissage cardiaque à un stress, mais ne semble être nécessaire ni pour la tachycardie observée au cours du stress, ni pour le fonctionnement cardiovasculaire normal au repos (Bao *et al.*, 2007). Parallèlement, des études réalisées chez les sujets tétraplégiques montrent que le système SSR est responsable de l'accélération rapide du rythme cardiaque en début d'exercice, ainsi que de la décélération rapide qui suit l'exercice (Takahashi *et al.*, 2007). De plus, l'hypotension orthostatique d'origine neurogénique résulte de perturbations de la composante nerveuse du système SSR (Goldstein *et al.*, 2003). Ainsi, le système SSR exerce des fonctions majeures dans l'adaptation de l'activité cardiaque à des conditions extrêmes (stress ou activité physique).

#### *Vascularisation et redistribution de l'afflux sanguin*

Tandis que la présence des récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques sur les muscles lisses vasculaires confère aux catécholamines des effets vasoconstricteurs puissants (Julius and Gudbrandsson, 1992; Paffenbarger *et al.*, 1968), l'expression de récepteurs  $\beta 2$  par les vaisseaux produit une vasodilatation. Le profil de distribution de ces récepteurs dans l'organisme fait qu'une activation du système SSR va entraîner une vasoconstriction spécifique de la vascularisation viscérale et cutanée, parallèlement à une vasodilatation des vaisseaux coronaires et musculaires, redirigeant ainsi l'afflux sanguin vers le cœur, les muscles et le cerveau. Le système SSR, en favorisant l'irrigation et l'activité de ces organes, va permettre une réaction adéquate de l'organisme, en terme d'intégration centrale et d'activité musculaire, ce qui sous-tend le principe de « fight or flight ». Chez l'humain, la recapture de la NA par les terminaisons sympathiques serait profondément impliquée dans la régulation de la distribution de l'activité sympathique entre le cœur, les vaisseaux, et le rein (Mayer, 1970), ce qui conférerait au système SSR une influence physiologique en aboutissant à des changements correspondants dans la fonction de ces organes.

#### *Rein et contrôle de la volémie*

##### **Diurèse**

A l'heure actuelle, les effets des catécholamines sur la diurèse restent mal compris et semblent dépendre, à l'instar de leur influence double sur le tonus vasculaire, du sous-type de récepteur activé. Ainsi, chez le mouton conscient, l'activation pharmacologique des récepteurs  $\alpha$  par l'injection de phényléphrine augmente la diurèse, tandis que l'administration d'un agoniste  $\beta$ -adrénergique (isoprotérénol) a un effet inverse (Vane *et al.*, 2004). Parallèlement, l'administration d'A dans l'aire médio-séptale augmente, de façon dose dépendante, la diurèse et l'excrétion urinaire de sodium et de potassium au travers de l'activation des récepteurs  $\alpha 1$  dans le NPV (de Arruda Camargo *et al.*, 2004). De plus, il semblerait que l'A exerce ses effets via la stimulation de

l'angiotensine-II et l'activation de ses différents sous-types de récepteurs au niveau du NPV. Enfin, les fibres TH-positives qui projettent sur l'hypothalamus seraient en partie responsables de la stimulation de la sécrétion d'AVP en réponse à un stress, notamment au cours d'une hypoglycémie induite par l'insuline (Dudas *et al.*, 2006), aboutissant ainsi à une réduction de la diurèse. L'influence des catécholamines et du système SSR sur la filtration rénale semble donc être complexe, et dépendre à la fois du site de libération, du site d'action, et de l'origine des différentes catécholamines.

### ***Système rénine-angiotensine***

Trois mécanismes majeurs déterminent la sécrétion de rénine : l'innervation rénale, les barorécepteurs rénaux, et la macula densa. La sécrétion de rénine est modulée par le SNC principalement via le SNS (King *et al.*, 1993; Skott and Jensen, 1993). Entre autre, la sécrétion de rénine est induite par la stimulation des nerfs rénaux, par l'infusion de catécholamines, ainsi que par l'accroissement de l'activité du SNS suite à une hypoglycémie, une occlusion carotidienne, une hémorragie non-hypotensive, une vagotomie (Derkx and Schalekamp, 1997). Les terminaisons sympathiques intra-rénales, qui innervent directement l'appareil juxta-glomérulaire, vont activer les récepteurs  $\beta_1$ , ce qui va aboutir à la sécrétion de rénine. Les effets  $\beta$ -adrénergiques découlent de l'augmentation du taux d'AMPC suite à une stimulation de l'adénylate-cyclase (King *et al.*, 1993; Osborn *et al.*, 1981; Skott and Jensen, 1993) et semblent être indépendants de la NO-synthase neuronale (Beierwaltes, 2003). De plus, l'activité des fibres sympathiques, en augmentant le taux d'AMPC, va induire la protéolyse de la pro-rénine (King *et al.*, 1993), et participer ainsi au soutien de sa sécrétion. De façon cohérente, une dénervation rénale entraîne une hypotension suite à une baisse de la sécrétion de rénine (Jacob *et al.*, 2005). Bien que l'effet majeur des catécholamines, par l'activation des récepteurs  $\beta$ , permette l'induction de la libération de rénine, des expériences réalisées sur des coupes et perfusions de reins ont suggéré que l'activation de récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques inhiberait quant à elle cette sécrétion (Blair, 1981).

En parallèle, la régulation de la sécrétion de rénine et du tonus vasculaire par le système SSR semblent être dépendantes des interactions existant entre ce dernier et le système rénine-angiotensine (Garcia *et al.*, 2003; Moosavi and Johns, 2003). En effet, d'une part, l'influence de la NA sur le tonus vasculaire requiert l'intégrité du système rénine-angiotensine intra-rénal ainsi que la participation des récepteurs à l'angiotensine II de type AT-I ; d'autre part, les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques contribuent à la réponse vasculaire rénale à l'angiotensine II (Garcia *et al.*, 2003).

Moosavi et Johns en concluent que les catécholamines participent à l'altération rapide de l'expression de gènes du système rénine-angiotensine intra-rénal (Moosavi and Johns, 2003).

#### I.C.4.3. Autres

Parallèlement à leurs fonctions majeures dans le maintien de la glycémie, les catécholamines vont exercer une influence sur divers processus physiologiques que nous ne détaillerons pas, tels que la facilitation de l'éjaculation, l'inhibition du péristaltisme vaginal, la piloérection, ou encore, ce qui fut à l'origine des travaux de JB Young sur la programmation du système SSR, le déclenchement de la sudation. De plus, les catécholamines inhibent la sécrétion des enzymes digestives et l'activité péristaltique du tube digestif, tout en stimulant la libération de ghréline (de la Cour *et al.*, 2007), et semblent participer à la régulation complexe du sommeil, présentant une réduction corrélée à la profondeur du sommeil, et atteignant un minimum durant le sommeil paradoxal (Rasch *et al.*, 2007). Par ailleurs, les catécholamines augmentent le métabolisme cellulaire, et la NA semble même pouvoir aggraver la balance entre l'apport cérébral d'oxygène et sa consommation chez les patients subissant une endartériectomie<sup>32</sup> (Sato 2007). Enfin, les catécholamines centrales (majoritairement la NA) exercent également une influence sur l'attention, la vigilance, et l'apprentissage (Dayan and Yu, 2006; Joels and De Kloet, 1989), ses implications dans la mémoire émotionnelle s'exerçant probablement au niveau de l'amygdale (McEwen and Sapolsky, 1995).

Ainsi, compte tenu de l'ensemble des fonctions du système SSR dans l'organisme mature, et plus particulièrement dans la régulation du métabolisme énergétique et cardiovasculaire, une perturbation de ses activités régulatrices suite à un environnement périnatal délétère pourrait constituer un des processus étiologiques initiant à la fois la résistance à l'insuline et l'hypertension programmées durant la vie précoce (Phillips and Barker, 1997; Phillips and Jones, 2006).

---

<sup>32</sup> désobstruction des vaisseaux coronaires

## I.D. Objectifs de la thèse

L'ensemble de ces données indique que le système SSR semble être une cible de la programmation, ce qui laisse présumer de possibles effets de la dénutrition maternelle périnatale sur son développement. Afin d'évaluer cette éventualité, nous avons alors choisi de porter notre attention sur l'étude du niveau terminal du système SSR, la glande médullosurrénale, car des données chez les animaux FR50 montraient une réduction de la masse des glandes et une altération à long terme de la réponse au stress. Les objectifs de cette thèse ont donc été multiples.

Dans un premier temps, il était nécessaire d'évaluer l'intégrité de la glande à la fin du stress nutritionnel, c'est-à-dire au sevrage (P21), et d'identifier les altérations précoces découlant potentiellement de la dénutrition maternelle. Dans ce but, nous avons tout d'abord étudié la structure de la médullosurrénale et l'organisation des CC et des fibres nerveuses au sein de celle-ci, afin de s'assurer du bon développement de l'organe. Parallèlement, nous avons cherché à déterminer si le régime FR50 avait un impact sur l'activité sécrétrice de la médullosurrénale en conditions de repos, en dosant les catécholamines plasmatiques et surréaliennes. Une approche différentielle de l'expression génique à l'aide de macroarrays et de RT-PCR a également été entreprise afin d'identifier des cibles potentielles de la dénutrition périnatale. Enfin, étant donné que la masse de la glande est réduite de façon irréversible au cours des premiers jours de vie extra-utérine, nous avons entrepris une étude des processus prolifératifs et apoptotiques des cellules de la médulla, en introduisant les techniques nécessaires à cette étude dans le laboratoire (marquages BrdU et TUNEL). L'ensemble de ces travaux a permis la rédaction de deux articles qui montrent l'existence de profondes altérations du développement de la médullosurrénale et des cellules chromaffines chez les animaux FR50 mâles au sevrage.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mieux comprendre les adaptations induites par le stress nutritionnel en étudiant la chronologie de la mise en place des altérations observées au sevrage. Nous avons ainsi suivi la mise en place de la structure de la médulla et de l'organisation des cellules chromaffines au cours de la période postnatale (de la naissance au sevrage). De la même façon, la fonctionnalité de la glande a été analysée au cours de l'ontogenèse, d'une part, en conditions de repos, et, d'autre part, en réponse à un stress métabolique (hypoglycémie hyperinsulinémique) connu pour activer spécifiquement le système sympathosurrénalien. Ces résultats, ainsi que l'étude parallèle de l'activité acétylcholine estérase, en tant que marqueur de l'innervation de la glande et des CC, nous a renseigné également sur le développement de

l'innervation de la médullosurrénale au cours de l'ontogenèse. Cette étude a donné naissance au troisième article de cette thèse, qui est actuellement en soumission.

Dans un troisième et dernier temps, nous avons tenté de répondre à la question essentielle de l'impact à long terme des adaptations précoces de la médullosurrénale induites par la restriction nutritionnelle. L'organisation des CC a donc été étudiée chez les rats FR50 âgés de 8 mois afin de déterminer le caractère transitoire ou définitif des modifications structurales observées au sevrage. Nous avons également évalué l'activité de la médullosurrénale et de son innervation en conditions de repos, ainsi que la réponse catécholaminergique de la glande à un jeûne. Parallèlement, nous avons comparé le profil d'expression génique de la surrénale des animaux FR50, évalué à l'aide de macroarrays, à celui obtenu au sevrage. Dans l'ensemble, ces résultats, en cours de rédaction sous la forme d'un article, confirment l'existence de répercussions à long terme des modifications précoces de la mise en place de la médullosurrénale et des CC suite à une dénutrition maternelle périnatale. En considérant l'influence majeure de la médullosurrénale et des catécholamines dans le maintien de l'homéostasie, ces adaptations du système SSR pourraient participer à la genèse des troubles métaboliques et cardiovasculaires programmés par le régime FR50.

**II EFFETS D'UNE DENUTRITION MATERNELLE PERINATALE SUR LE  
DEVELOPPEMENT DE LA MEDULLOSURRENALE CHEZ LE RAT MALE**

## **II.A. Influence de la dénutrition maternelle sur la mise en place et la différenciation des cellules de la médullosurrénale chez le rat mâle au sevrage**

Nous avons ainsi cherché à caractériser les effets d'une dénutrition maternelle périnatale sur la différenciation et la mise en place des cellules de la médullosurrénale, et plus particulièrement des CC. En considérant que la période de restriction alimentaire du régime FR50, qui s'étend de E14 à P21, s'applique précisément au cours de la fenêtre de différenciation et de mise en place des cellules de la médulla, le modèle FR50 représente donc un terrain expérimental adéquat à l'étude de tels effets potentiels. De plus, certaines données laissent à penser que les animaux FR50 pourraient présenter des altérations de la glande médullosurrénale. D'une part, la masse absolue de la glande surrénale est réduite chez les animaux FR50 au cours du développement postnatal ainsi que chez l'adulte, tandis que sa masse relative (au poids corporel) est augmentée (Leonhardt *et al.*, 2002; Lesage *et al.*, 2001). D'autre part, bien que de nombreuses altérations de l'axe HHS, aboutissant chez l'adulte à une hyperactivité du cortex surrénalien, aient pu être identifiées chez les animaux FR50 (Lesage *et al.*, 2006; Vieau *et al.*, 2007), une seule étude s'est attardée sur l'activité du système SSR (Lesage *et al.*, 2002a). Elle a pu mettre en évidence une diminution de la concentration plasmatique en NA en réponse à un stress par immobilisation chez les rats FR50 âgés de 4 mois, comparés aux contrôles. Ainsi, cela suggérerait que l'activité du système SSR, et par là même des CC, puisse elle aussi être perturbée suite à une dénutrition maternelle périnatale. Afin de caractériser les effets potentiels du régime FR50 sur la différenciation des cellules de la médullosurrénale, nous avons choisi d'analyser, au terme de la dénutrition, la structure et la morphologie, l'innervation, l'activité, l'expression génique, la prolifération et l'apoptose des cellules de la médullosurrénale chez des animaux contrôles et FR50. La majeure partie des données obtenues a donné naissance aux deux premiers articles issus de cette thèse. De plus, les résultats d'un certain nombre d'expériences complémentaires, qui sont brièvement expliquées ci-dessous, seront présentés et discutés par la suite.

## II.A.1. Résultats

### II.A.1.1. Article 1

**Résumé :** Un certain nombre de données épidémiologiques suggère que des maladies chroniques de l'adulte, telles que le diabète de type II et l'hypertension, peuvent être programmées au cours de la vie fœtale et postnatale précoce. Les régions du système nerveux qui gouvernent les fonctions végétatives ainsi que l'axe HHS sont particulièrement sensibles au statut nutritionnel au cours de la période périnatale. Bien que de récentes publications aient rapporté que l'activité du système SSR puisse être altérée par les événements au cours de la vie précoce, les effets d'une restriction nutritionnelle précoce sur le développement de la médullosurrénale restaient inconnus. A l'aide d'un modèle de restriction alimentaire maternelle de 50% de la dernière semaine de gestation au sevrage chez le rat, des expériences d'immunohistochimie nous ont permis de déceler des altérations de l'agrégation des CC et de la fasciculation des fibres nerveuses dans la médulla des animaux FR50 mâles au sevrage. De plus, ces modifications morphologiques sont associées à une augmentation des taux circulants de catécholamines en conditions de repos (de 55% pour l'A, et de 41% pour la NA). A l'aide de « macroarrays », nous avons pu identifier 21 gènes dont l'expression est affectée par la restriction nutritionnelle maternelle. Des expériences de RT-PCR semi-quantitative ont permis de confirmer la surexpression de 4 gènes impliqués dans la différenciation neuroendocrine et la plasticité neuronale (chromogranine B ou sécrétogranine-I, GAP-43, neurofilament 3 et Slit2) dans les glandes surrénales des animaux FR50. En utilisant la technique d'hybridation *in situ*, nous avons montré que ces gènes sont quasi-exclusivement exprimés dans la médulla. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la dénutrition maternelle périnatale altère de façon marquée la différenciation de la médullosurrénale au cours de la vie postnatale, augmentant l'activité des CC au sevrage. Ces adaptations pourraient persister à l'âge adulte et participer à la programmation des maladies chroniques de l'adulte.

# Maternal Perinatal Undernutrition Alters Neuronal and Neuroendocrine Differentiation in the Rat Adrenal Medulla at Weaning

Olivier Molendi-Coste,\* Luca Grumolato,\* Christine Laborie, Jean Lesage, Eric Maubert, Hafida Ghzili, Hubert Vaudry, Youssef Anouar, Christophe Breton, and Didier Vieau

Unité Propre de Recherche et de l'Enseignement Supérieur Equipe Associée 2701 (O.M.-C., C.L., J.L., C.B., D.V.), Laboratoire de Neuroendocrinologie du Développement, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 413 (L.G., H.G., H.V., Y.A.), Laboratoire de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire, Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides 23, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France; and INSERM-Avenir (E.M.), Groupement d'Intérêt Public Cycecon, 14000 Caen, France

Epidemiological studies suggest that chronic adult diseases, such as type 2 diabetes and hypertension, can be programmed during fetal and early postnatal life. The nervous system regions governing vegetative functions and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis are particularly sensitive to the perinatal nutritional status. Despite recent reports demonstrating that the activity of the sympathoadrenal system can be altered by early life events, the effects of maternal nutrient restriction on the adrenal medulla remain unknown. Using a rat model of maternal perinatal 50% food restriction (FR50) from the second week of gestation until weaning, immunohistochemical experiments revealed alterations in chromaffin cell aggregation and in nerve fiber fasciculation in the adrenal medulla of FR50 pups. These morphological changes were associated with enhanced circulating levels of catecholamines after decapitation (epinephrine by 55% and nor-

epinephrine by 41%). Using macroarrays, we identified several genes whose expression was affected by maternal nutrient restriction. Semiquantitative RT-PCR confirmed the overexpression of four genes involved in neuroendocrine differentiation and neuronal plasticity (chromogranin B, growth-associated protein 43, neurofilament 3, and Slit2) in the adrenal glands of FR50 rats. Using *in situ* hybridization, we showed that these genes are solely expressed in the adrenal medulla. Together, our results suggest that perinatal maternal undernutrition markedly alters the differentiation of the adrenal medulla during postnatal life, resulting in enhanced activity of chromaffin cells at weaning. These alterations may persist in adulthood and participate to the programming of chronic adult diseases. (*Endocrinology* 147: 3050–3059, 2006)

**I**N HUMANS, INTRAUTERINE growth retardation (IUGR) is frequently associated with the development of several pathologies, including insulin resistance, type 2 diabetes, and hypertension in later life (1–3). Such an association between IUGR and the appearance of diseases in adult life has led to the fetal programming hypothesis (1), which implies that adverse environmental factors acting *in utero* program the development of fetal tissues, producing dysfunctions and diseases in adults. This concept is supported by numerous studies in animal models. In rodents, uterine artery ligation or major caloric restriction lead to severe nutrient restriction in the fetus, producing IUGR and subse-

quent permanent hypertension, dysregulation of glucose metabolism, and insulin resistance in later life (4, 5).

In mammals, it is well established that maturation of the nervous system depends in part on perinatal nutritional factors and postnatal environmental stimulation. Brain regions governing vegetative functions and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis are particularly sensitive to such cues acting in prenatal and postnatal periods (6, 7). The sympathetic nervous system and the adrenal medulla, *i.e.* the sympathoadrenal system (SAS), are also affected by nutritional factors during development (6). It has been shown that protein restriction in maternal food during pregnancy reduces norepinephrine (NE) turnover in several tissues in adults (6). Likewise, limitation of food availability during lactation, using animals reared in large litters, abolishes the stimulatory effect of dietary sucrose on the cardiac sympathetic nervous system activity in rat (8). These observations strongly suggest that neonatal nutrition may influence the development and the activity of the SAS.

Sympathoadrenal (SA) progenitor cells originating from pluripotent stem cells in the embryonic trunkal neural crest aggregate at the dorsal aorta and subsequently migrate into a ventrolateral direction to colonize the adrenal gland, in which they lose neuronal traits and finally differentiate into neuroendocrine chromaffin cells (9, 10). The final step of

First Published Online February 23, 2006

\* O.M.-C. and L.G. contributed equally to this work.

Abbreviations: CgB, Chromogranin B; Cyclo B, cyclophilin B; E, epinephrine; E21, embryonic d 21; FR50, food restriction 50%; GAP43, growth-associated protein 43; HPA axis, hypothalamo-pituitary-adrenal axis; IUGR, intrauterine growth retardation; NE, norepinephrine; NeuF3, neurofilament 3; P21, postnatal d 21; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PNMT, phenylethanolamine-*N*-methyl transferase; SA, sympathoadrenal; SAS, SA system; SSH, suppression subtractive hybridization; TH, tyrosine hydroxylase.

*Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

chromaffin cell differentiation is characterized by the appearance of a large number of epinephrine (E)-producing cells resulting from the induction of phenylethanolamine-*N*-methyl transferase (PNMT) gene expression by glucocorticoids (11). However, after birth, some chromaffin cells that still express neuronal-type markers, such as the major synaptosomal growth-associated protein 43 (GAP43), retain their noradrenergic phenotype (12). The differential expression of adhesion molecules determines the architecture of the adrenal gland by segregating chromaffin cells into homophenotypic groups of either E or NE cells (13). Proliferation of chromaffin cells occurs mainly during fetal and neonatal development. However, in contrast to sympathetic neurons, chromaffin cells retain their ability to proliferate after birth and throughout the whole life span in rat, at least *in vitro* (14, 15).

We have shown previously that maternal 50% food restriction (FR50), during the last week of gestation and lactation, disturbs the activity of the HPA axis at weaning under both resting and stress conditions (16). In particular, we demonstrated that ether inhalation-induced plasma ACTH increase is reduced in FR50 pups and that the plasma corticosterone values in these animals are lower than baseline after this stressful procedure. In addition, FR50 adult male rats still show impaired adrenocortical responsiveness to stress and present elevated basal plasma corticosterone levels compared with controls, as well as an altered responsiveness of the SA axis to restraint stress (17). However, although numerous studies have deciphered the consequences of perinatal maternal undernutrition on the HPA axis activity in the offspring, the impact of early life nutrient restriction on SA development and adrenal medullary function has never been reported. Because it has been shown clearly that putative noxious signals (*i.e.* hypoxia, glucocorticoid hormones, and placental restriction) may profoundly affect chromaffin cell development (18–20), we hypothesized that perinatal maternal undernutrition might alter the neuronal and neuroendocrine differentiation of the adrenal medulla in the male rat offspring at weaning. To test this hypothesis, we compared the adrenomedullary organization, function, and gene expression in 21-d-old male rats malnourished during their perinatal life and in age-matched control animals.

## Materials and Methods

### Animals and regimen

Male (300–350 g) and female (250–300 g) Wistar rats were purchased from Charles Rivers Laboratories (L'Arbresle, France). The animals were housed five per cage with a controlled light cycle (12 h-light, 12-h dark cycle; lights on at 0700 h) and temperature ( $22 \pm 2$  C) with free access to food (regular rat chow number 113, containing 22% protein, 5% fat, and 53% carbohydrates; UAR, Villemoisson-sur-Orge, France) and tap water. After 14 d of acclimation, females were mated with a male for one night. Day 0 of pregnancy was defined as the day immediately after the night during which males were present, if spermatozoa were found in the vaginal smears. Pregnant rats were then housed in individual cages. Animal use accreditation by the French Ministry of Agriculture (number 04860) has been granted to our laboratory for experimentation with rats. All animal experiments were conducted in accordance with the European Communication Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC).

Two groups of pregnant rats were studied. In the control group, dams

were fed *ad libitum* during gestation [from embryonic d 0 (E0) to E21] and the 3 wk of lactation [from E21 to postnatal day 21 (P21)]. In the FR50 group, females received 50% of *ad libitum* intake determined by the amount of food consumed by control females from E14 until P21 in a pilot study. Briefly, FR50 females received 12 g/d food from E14 to E21. Then, available food was gradually increased from 12 to 22 g/d (E21 to P6), from 27 to 31 g/d (P7–P13), and from 35 to 40 g/d (P14–P21). Dams delivered spontaneously during the night between E21 and P1, and pups were weighed in the morning of P1 and at weaning (P21). To improve survival of very small pups, litter size was reduced to eight pups per litter at birth in both groups. Experiments were conducted only on male pups.

### Plasma and tissue collections

At weaning (P21), pups were decapitated between 0800 and 1100 h. Decapitation was properly conducted by skilled staff with well-maintained equipment, ensuring rapid death and plasma collection. Trunk blood samples were collected in tubes prerinsed with 5% EDTA and centrifuged. Plasma samples were stored at  $-80$  C until determination of circulating catecholamines. Usually, the right adrenals were frozen in liquid  $N_2$  for catecholamines or gene expression assessment. The left adrenals were frozen on dry ice for *in situ* hybridization studies or postfixed for 24 h in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer and cryoprotected by incubation for 24 h in PBS 0.05 M containing 20% sucrose for immunohistochemistry and histology. The adrenal glands were cut into serial 12- $\mu$ m sections, mounted on gelatin-coated slides, and directly stored at  $-80$  C for immunohistochemistry and histological analysis or dried at 63 C for 1 min before performing *in situ* hybridization.

### Histology

After hematoxylin and picro-indigo-carmin staining, the relative proportion of medulla and cortex was determined using a scanner coupled with the computer-assisted image analysis software Multi-Analyst (Bio-Rad, Hercules, CA). Five adrenals were analyzed for each experimental group, and five adjacent slices from the median region of the medulla were analyzed for each adrenal gland.

### Immunohistochemistry

For chromaffin cell staining, sections of adrenal glands were immunostained with a polyclonal rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (Jacques Boy Institut, Reims, France). Immunostaining of differentiated adrenergic chromaffin cells was performed with a polyclonal rabbit anti-PNMT antibody (Chemicon, Temecula, CA). Immunostaining of NE chromaffin cells and nerve fibers was performed with a monoclonal mouse anti-GAP43 antibody (Sigma, St. Louis, MO).

Adrenal sections were pretreated with 1.5%  $H_2O_2$  in 20% methanol and 0.2% Triton X-100 to inactivate endogenous peroxidases, and un-specific labeling was blocked with 2% donkey serum (Sigma) in 0.1 M PBS for 30 min. Sections were then rinsed with 0.1 M PBS and incubated with anti-GAP43 (1:500 dilution) overnight at room temperature. Sections were subsequently incubated with a biotinylated antimouse secondary antibody (1:300 dilution) (Chemicon) for 2 h at room temperature, and labeling was amplified with biotin and avidin-horseradish peroxidase reagents as described in the ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Color development of immunoreactivity was performed for 15 min, using diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

For double-immunofluorescence staining, tissue slices were incubated with anti-TH or anti-PNMT antibody, respectively (1:1000 dilution), and anti-GAP43 antibody (1:500 dilution) overnight at room temperature. Then, sections were incubated with a mixture of fluorescein isothiocyanate-conjugated goat antirabbit and tetramethylrhodamine isothiocyanate-conjugated goat antimouse secondary antibodies (1:300 dilution) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) for 2 h at room temperature. Sections were then rinsed in PBS and mounted with Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Carpinteria, CA).

Sections were examined with a Zeiss (Gottingen, Germany) Axioplan Microscope II equipped with  $\times 20$  and  $\times 40$  objectives and appropriate fluorescent barrier filters.

The determination of NE clusters and nerve fiber density was performed with Multi-Analyst software (Bio-Rad) on selected representative pictures (see Fig. 2). Five adrenals were analyzed from each experimental group, and five adjacent sections from the median region of the medulla were analyzed for each adrenal gland. The area, number, and total area of NE clusters as well as the section area, number, and total section area of nerve fibers were normalized to the area of medulla examined.

### HPLC

Adrenal glands were sonicated in 1 ml ice-cold 0.2 M HClO<sub>4</sub> and centrifuged at 20,000 × g at 4°C for 20 min. The supernatants were used to determine NE and E contents by HPLC coupled with electrochemical detection as described previously (21). Catecholamine assays in plasma samples were also performed by HPLC after alumina extraction as described previously (21).

### Macroarray preparation

A microarray containing more than 15,000 mouse embryonic/placental cDNA probes (22) obtained from the National Institute on Aging mouse 15K cDNA library and corresponding to 15,264 Unigene clusters (for details, see <http://lgsun.grc.nia.gov/cDNA/15k.html>) as well as the suppression subtractive hybridization (SSH) method were used to identify genes overexpressed in pheochromocytoma PC12 cells after differentiation by 100 nM pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP38) (23). Clones identified by microarray and SSH analyses were amplified with universal primers and the DyNAzyme EXT DNA polymerase, following the instructions of the manufacturer (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) in a PCRexpress thermal cycler (Hybaid, Paris, France) and used as probes to make a macroarray. The quality of the amplified DNA was checked by migration on a 1% agarose gel. The PCR products contained in a 384-well plate were directly printed on Hybond NX membrane (Amersham Biosciences, Les Ulis, France) using a ChipWriter system (Virtek, Waterloo, Ontario, Canada). These filters were denatured with a 0.4 M NaOH, 0.1 M NaCl solution for 5 min and neutralized with 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.2) for 5 min. The macroarrays were hybridized with target cDNAs derived from control and FR50 pups as follows: total RNA was isolated using the Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) purified on RNeasy Mini Spin Columns (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified by spectrophotometry. The quality of the RNA was checked by ethidium bromide staining of the 28S and 18S ribosomal RNA on a formaldehyde-agarose gel. cDNAs were labeled during synthesis in the presence of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) according to standard National Human Genome Research Institute protocols (<http://www.hngri.nih.gov/UACORE/protocols.html>). Images of the hybridized macroarrays obtained from a PhosphorImager (Amersham Biosciences) were quantified with the XdotsReader software (Cose, Dugny, France). Hybridization signals were normalized to those of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase probe that was printed at several locations of the macroarray. Three independent experiments were performed for each hybridization, and mean values were calculated.

### Semiquantitative RT-PCR

RNA was extracted and purified from adrenals using the TRIzol reagent (Invitrogen, Strasbourg, France). The quality of total RNA was

assessed by determining the 260/280 absorbance ratio and by gel electrophoresis in agarose. The semiquantitative RT-PCR method used here has been described and validated previously (24).

Briefly, 3  $\mu$ g total RNA was reverse transcribed into cDNA using 3  $\mu$ g random hexamers and 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). One thirtieth of the first-strand synthesis reaction was amplified using 1 U Taq DNA polymerase (Qbiogen, Illkirch, France) and 2  $\mu$ M of each forward and reverse primers. The cycling parameters were as follows: 94°C for 1 min 30 sec, 60°C for 1 min 30 sec, and 72°C for 2 min. Negative control RT-PCRs were performed by omitting RT from the reaction mixture. The position of the primers as well as the predicted size of the amplification products are summarized in Table 1. Cyclophilin B (Cyclo B) was used as an internal standard. Moreover, the priming sites were separated by an intron, thus preventing amplification of any contaminating genomic DNA. Pilot experiments were conducted to determine the optimal cycle number for each primer pair for linear semiquantitative amplification. Each experiment was performed in triplicate and gave similar results. After amplification, the samples were separated on a 1% gel agarose, visualized by ethidium bromide, and quantified by Multi-Analyst software (Bio-Rad).

### In situ hybridization

Sections (12- $\mu$ m-thick) were mounted on gelatin-coated slides, dried, and kept at -80°C. *In situ* hybridization was performed as described previously (25). cDNAs for chromogranin B (CgB), GAP43, neurofilament 3 (NeuF3), and Slit2 were subcloned into pGEM-T easy. The CgB probe was a 472-bp fragment linearized with *SacI* (antisense probe). The GAP43 probe was a 454-bp fragment linearized with *ApaI* (antisense probe). The NeuF3 probe was a 444-bp fragment linearized with *ApaI* (antisense probe). The Slit2 probe was a 486-bp fragment linearized with *SacI* (antisense probe). Riboprobes were labeled using [<sup>35</sup>S]UTP (1,300 Ci/mmol; PerkinElmer, Paris, France) and synthesized according to the previously described procedure (25). Controls with the sense probes did not produce any specific hybridization signals. All slides were exposed to x-ray films (Biomax-MR; Eastman Kodak, Le Pontet, France) for 6 h for the CgB probe, 7 d for the GAP43 and NeuF3 probes, and 20 d for the Slit2 probe.

### Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the unpaired Student's *t* test and the SigmaStat software (Systat Software, Port Richmond, CA). *P* < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Adrenal morphology

Anatomical characteristics of adrenal glands from 21-d-old animals from *ad libitum* fed (control) and food-restricted (FR50) dams are presented in Figs. 1 and 2. Consistent with a previous report (16), the absolute adrenal weight was reduced in 21-d-old FR50 pups [17.1  $\pm$  0.38 mg in control (*n* = 35) vs. 10.4  $\pm$  0.24 mg in FR50 (*n* = 35); *P* < 0.001], whereas the relative adrenal weight was significantly increased

**TABLE 1.** Primers and probes used for macroarray validation

Sequence (mRNA)	GenBank accession no.	Primer position		PCR products	Number of cycles
		Forward	Reverse		
CgB	NM_012526	184–208	655–631	472	28
Cyclo B	AF071221	155–179	610–586	456	27
GAP43	NM_017195	217–241	670–646	454	34
NeuF3	NM_017029	858–882	1301–1277	444	34
PNMT	X14211	92–116	545–521	454	28
TH	M10244	61–85	547–523	487	30
Slit2	NM_022632	1515–1539	2001–1977	486	33

Accession number, primers position, PCR products, and number of cycles for semiquantitative RT-PCR amplification are indicated. Accession numbers correspond to the mRNA sequences.

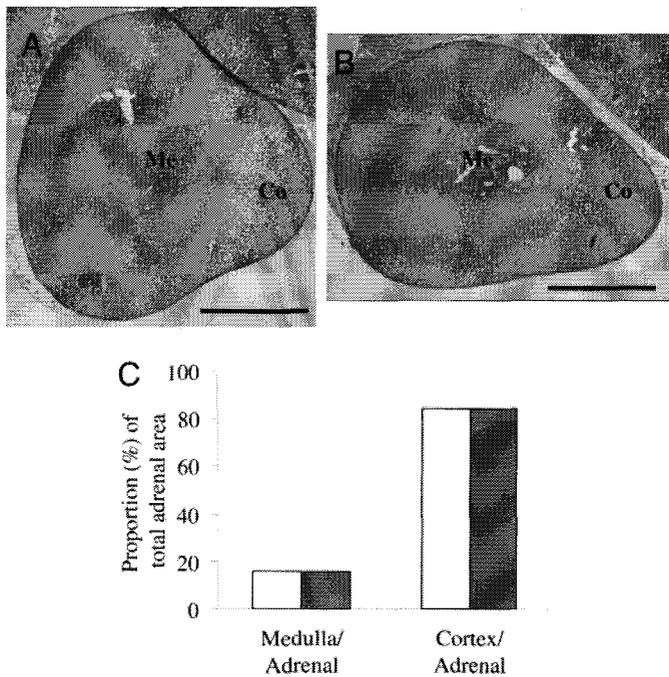


FIG. 1. Pictures of median adrenal gland histological slices from control (A) and FR50 (B) in 21-d-old animals. C represents the area measurements expressed as medulla/adrenal and cortex/adrenal proportions for control (white bars) and FR50 (gray bars) adrenal glands. Data represent means  $\pm$  SEM ( $n = 5$  animals per group). Scale bars, 1 mm. Co, Adrenal cortex; Me, adrenal medulla.

( $3.70 \pm 0.07$  mg/10 g body weight in control *vs.*  $4.01 \pm 0.08$  mg/10 g body weight in FR50;  $P < 0.01$ ). However, as shown in Fig. 1C, the proportion of medulla or cortex to the total adrenal area was not different between the two groups (medulla/adrenal area,  $16 \pm 0.6\%$  in control *vs.*  $16 \pm 0.9\%$  in FR50,  $P = 0.9691$ ; cortex/adrenal area,  $85 \pm 0.6\%$  in control *vs.*  $84 \pm 0.9\%$  in FR50,  $P = 0.9691$ ), indicating that the mass loss affected to the same extent the two tissues.

The adrenal gland organization from control and FR50 rats (P21) was studied by immunohistochemistry ( $n = 8$  per group). As shown in Fig. 2, double-immunofluorescence labeling for PNMT and GAP43 revealed that GAP43 was only expressed in NE chromaffin cells but was undetectable in PNMT-expressing E chromaffin cells in both control (Fig. 2A) and FR50 (Fig. 2B) adrenal medulla. The number of TH- and PNMT-immunoreactive cells in the adrenal medulla was similar in FR50 and control rats (data not shown).

Using the GAP43 and PNMT labeling, the organization of chromaffin cells was examined. The shape and dimensions of E and NE chromaffin cells were similar in control and FR50 adrenals. Within the glands from control rats, NE chromaffin cells formed few large clusters preferentially localized at the periphery of the medulla (Fig. 2, A and C, 100% of the glands examined), whereas, in the FR50 adrenal glands, NE chromaffin cells were organized in much smaller isolated groups of cells scattered throughout the medulla (Fig. 2, B and D, 75% of the glands examined). As summarized in Table 2, the relative area of NE clusters was reduced in FR50 medulla ( $5.94 \pm 0.22\%$  in controls *vs.*  $1.44 \pm 0.12\%$  in FR50;  $P < 0.05$ ), whereas the relative number of NE chromaffin cell clusters

was increased in FR50 medulla compared with controls ( $2.2 \pm 0.26$  clusters in controls *vs.*  $6.89 \pm 0.11$  clusters in FR50;  $P < 0.001$ ). However, the total relative area was not different between the two groups ( $13.18 \pm 1.55\%$  in control *vs.*  $9.93 \pm 0.89\%$  in FR50;  $P = 0.18$ ). In contrast, the architecture of E chromaffin cell clusters was not different between control and FR50 medulla.

Maternal perinatal food restriction also altered the organization of the intraadrenal innervation. In the adrenal medulla of control rats, fibers labeled with GAP43 formed few large bundles that innervated some chromaffin cell groups (Fig. 2E), whereas, in the adrenals of FR50 rats, the fiber network innervating cell clusters was mainly composed of more numerous and smaller processes scattered within the medulla (Fig. 2F, 75% of the glands examined). The relative section area and number of nerve fibers are reported in Table 2. The relative section area was significantly reduced in FR50 adrenals ( $0.15 \pm 0.02\%$  in controls *vs.*  $0.023 \pm 0.002\%$  in FR50;  $P < 0.001$ ), whereas the relative number increase was not significant in FR50 medulla compared with controls ( $3.03 \pm 0.57$  fibers in controls *vs.*  $4.73 \pm 1.52$  fibers in FR50;  $P = 0.29$ ). However, the apparent reduction of the relative total density of nerve fibers was not significant between control and FR50 animals ( $0.44 \pm 0.07\%$  in control *vs.*  $0.11 \pm 0.03\%$  in FR50;  $P = 0.11$ ).

#### Plasma and adrenal catecholamine concentrations

To determine whether the structural alterations observed in the adrenal medulla of FR50 pups have physiological consequences, we evaluated adrenal contents as well as plasma levels of E and NE by HPLC analysis after decapitation procedure. As shown in Fig. 3, the relative E and NE adrenal contents were similar in controls and FR50 pups ( $0.37 \pm 0.042$   $\mu$ g E/mg gland in control *vs.*  $0.41 \pm 0.053$   $\mu$ g E/mg gland in FR50;  $0.11 \pm 0.009$   $\mu$ g NE/mg gland in control *vs.*  $0.11 \pm 0.014$   $\mu$ g NE/mg gland in FR50). The E/NE ratio was also unchanged in FR50 compared with control pups ( $3.34 \pm 0.18$  in control *vs.*  $3.66 \pm 0.16$  in FR50). In contrast, plasma E and NE levels were increased by 55% ( $8.91 \pm 1.3$  ng/ml in control *vs.*  $13.8 \pm 0.76$  ng/ml in FR50;  $P < 0.05$ ) and by 41% ( $2.4 \pm 0.2$  ng/ml in control *vs.*  $3.4 \pm 0.36$  ng/ml in FR50;  $P < 0.05$ ), respectively. However, the E/NE ratio in plasma was not affected in FR50 compared with control pups ( $3.8 \pm 0.55$  for control *vs.*  $4.35 \pm 0.52$  for FR50).

#### Analysis of gene expression in the adrenal gland of food-restricted animals

Using a macroarray, we compared the expression of 384 genes, previously shown to be regulated during PACAP-induced differentiation of PC12 cells (23), in the adrenals of weaning control and FR50 animals. Results are presented in Table 3 and expressed as FR50/control ratios. Among the 384 genes coated on the macroarray, only one gene was under-expressed (ratio  $< 0.7$ ), whereas 20 genes were over-expressed (ratio  $> 1.5$ ) in FR50 compared with control animals. These genes were classified in functional categories, as shown in Table 3.

To validate the variations of gene expression obtained using the macroarray, we performed semiquantitative RT-

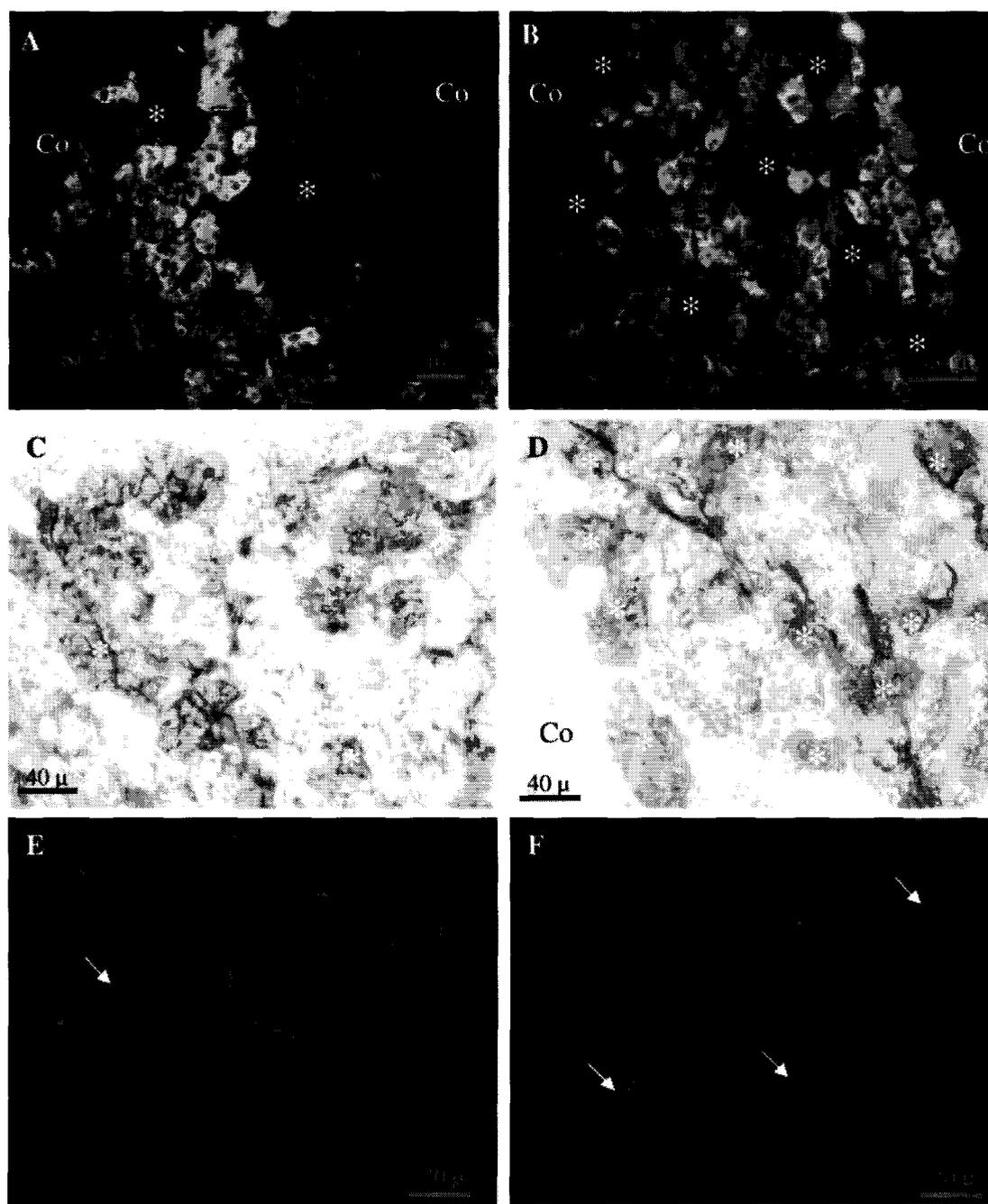


FIG. 2. GAP43 and PNMT immunohistochemistry in 21-d-old animals adrenal glands from *ad libitum* (A, C, E) and restricted (B, D, F) fed dams. In A and B, double immunofluorescence was performed for PNMT (green) and GAP43 (red), showing confined expression of GAP43 to NE chromaffin cells. In C and D, diaminobenzidine tetrahydrochloride staining was performed for GAP43, showing only NE-labeled chromaffin cells clusters (arrows). A and C show the typical organization of adrenal glands from control animals, with large clusters of NE chromaffin cells (\*). B and D show morphological alterations of adrenals from FR50 animals, consisting of more numerous NE clusters (\*) with reduced size. E and F show GAP43 staining in intramedullary nerve fibers (arrows) in control (E) and FR50 (F) adrenals. Scale bars: A–D, 40  $\mu$ m; E, F, 20  $\mu$ m. Co, Adrenal cortex.

PCR analysis. CgB, GAP43, NeuF3, and Slit2 genes, known to be involved in neuroendocrine and/or neuronal differentiation or implicated in secretory activity, were chosen as candidates. We also analyzed the expression of TH, PNMT, and Cyclo B mRNAs, three genes that were not included in the macroarray analysis (Fig. 4A). Interestingly, the expression of TH ( $1.07 \pm 0.16$  in control *vs.*  $0.96 \pm 0.15$  in FR50),

PNMT ( $1.73 \pm 0.28$  in control *vs.*  $1.61 \pm 0.26$  in FR50), and Cyclo B ( $1.95 \pm 0.18$  in control *vs.*  $2 \pm 0.14$  in FR50) was not impaired by maternal perinatal food restriction compared with controls (Fig. 4B). In contrast, CgB ( $1.13 \pm 0.11$  in control *vs.*  $1.71 \pm 0.25$  in FR50;  $P < 0.05$ ), GAP43 ( $1.13 \pm 0.11$  in control *vs.*  $1.71 \pm 0.25$  in FR50;  $P < 0.05$ ), NeuF3 ( $0.89 \pm 0.08$  in control *vs.*  $1.47 \pm 0.21$  in FR50;  $P < 0.05$ ), and Slit2 ( $0.78 \pm$

**TABLE 2.** NE clusters and nerve fiber density

	Clusters			Fibers		
	Relative area	Number	Relative total area	Relative section area	Number	Relative total section area
Control	5.94 ± 0.22%	2.22 ± 0.26	13.18 ± 1.55%	0.15 ± 0.02%	3.03 ± 0.57	0.44 ± 0.08%
FR50	1.44 ± 0.12% <sup>a</sup>	6.89 ± 0.11 <sup>b</sup>	9.93 ± 0.89%	0.023 ± 0.002% <sup>b</sup>	4.73 ± 1.52	0.11 ± 0.03%

GAP43 immunostaining pictures were used for determination of NE cluster area, number, and total area, as well as nerve fiber section area, number, and total section area. Results are normalized to the area of medulla examined ± SEM.

<sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>  $P < 0.001$  FR50 *vs.* control.

0.11 in control *vs.* 1.68 ± 0.24 in FR50;  $P < 0.05$ ) mRNA levels were significantly increased in P21 FR50 adrenals (Fig. 4B). These results are in agreement with values obtained by the macroarray analysis (Fig. 4C and Table 3).

#### *In situ* hybridization analysis of gene expression

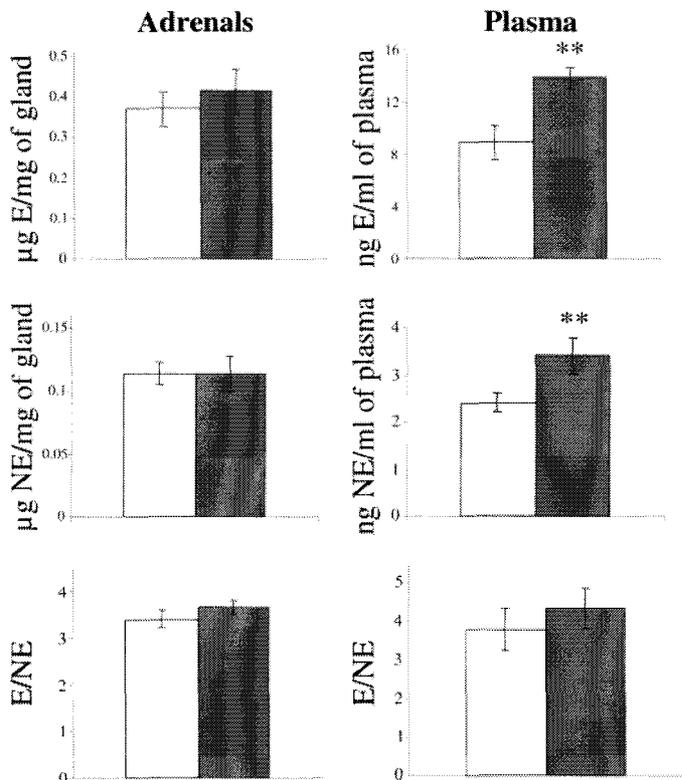
*In situ* hybridization experiments showed that CgB, GAP43, NeuF3, and Slit2 mRNAs are mainly expressed within the adrenal medulla in both control (Fig. 5) and FR50 (data not shown) adrenal glands. In contrast to the other transcripts, GAP43 labeling was scattered in groups of medullary cells, probably due to its restricted expression in NE chromaffin cell clusters (Fig. 5). No hybridization signal was observed using the sense riboprobes (data not shown).

### Discussion

We observed previously that, in rat, maternal perinatal FR50 results in a reduction of the absolute weight of the

adrenal gland at weaning and impairs the activity of the HPA axis from postnatal development to adulthood (16, 17). We show here that the mass loss of the adrenal gland affected to the same extent the medulla and the cortex, suggesting that the SAS functionality could also be altered. However, the relative mass of neonatal adrenals compared with the body mass was increased in undernourished rats, suggesting that adrenal growth is maintained within an optimal range through compensatory mechanisms. The maintenance of the adrenal mass appears to be of primary importance for neonates because circulating glucocorticoids and catecholamines play essential roles in the adaptation to extra-uterine life (26).

Our results reveal that maternal FR50 alters the structural organization of the adrenal medulla of weaning rats. Clusters of NE chromaffin cells were smaller, more abundant, and more widely distributed in the medulla in FR50 adrenals compared with controls. Development of chromaffin cells begins at approximately E14–E16 and is characterized by the differentiation of SA precursors to neuroendocrine cells and segregation of chromaffin cells into homophenotypic groups. Differential expression of adhesion molecules between E and NE chromaffin cells determines the formation of clusters in the adrenal medulla. Indeed, coexpression of L1 and neural cell adhesion molecule might be responsible for the association of NE chromaffin cells in homophenotypic aggregates by a process of differential adhesion, because E chromaffin cells lack L1 (13). During the differentiation of SA cells to neuroendocrine cells, the expression of some neuronal markers, such as NeuF proteins, L1, and GAP43, is repressed in differentiated E chromaffin cells and maintained in differentiated NE cells (12, 27). Because GAP43 is associated with synaptic plasticity, its presence in chromoblasts and its persistence only in NE chromaffin cells suggests a possible role in the migration and/or aggregation of chromaffin cells into the adrenal medulla. As reported by Grant *et al.* (12), predictive NE chromaffin cells form few large clusters as early as E16.5. Thereafter, small NE clusters observed in the medulla of FR50 weaning rats could correspond not only to a delayed settling of chromaffin tissue but also to a transitory or permanent remodeling of its structure. At weaning, intense GAP43 staining was detected in nerve fibers that innervate the adrenal medulla of both control and FR50 rats. In FR50 rats, nerve bundles were thinner and more scattered throughout the medulla, suggesting a profound alteration in their fasciculation. However, we do not know to what extent these modifications affect sympathetic activity. During ontogeny, preganglionic sympathetic nerves invade the adrenal gland at E15 and are identified in apposition to chromaffin cells at E17 (9). However, synaptic connections become func-



**FIG. 3.** Adrenal content, plasma levels of E and NE, and E/NE ratio in 21-d-old animals from *ad libitum* (white bars) and restricted (gray bars) fed dams. Data represent means ± SEM (n = 8 animals per group). \*\*,  $P < 0.01$ , FR50 *vs.* control.

**TABLE 3.** Genes differentially expressed in 21-d-old animals adrenal glands

Function	Genes (homologies)	FR50/control	GenBank accession no.
Proliferation/DNA synthesis	DNA methyltransferase 3A (Dnmt3A)	1.52	AW549977
	Extracellular proteinase inhibitor (Expi): WNDM1	1.56	AU040587
	GAP43	1.89	AW556809
Transcription factors and regulators	Mini chromosome maintenance deficient 2 (MCMd2)	1.87	AW553939
	Lmo1 gene for putative human LMO1 homolog	1.59	AU015284
	Antigen identified by monoclonal antibody MRC-OX2	0.66	AW558554
	Pleiomorphic adenoma gene-like 2 (PLAGL2)	1.63	AW556843
	Zinc finger protein 265	1.53	NP976225
Signaling	EST highly similar to Faciogenital dysplasia protein homolog 1	1.72	AK040910
	Membrane interacting protein of RGS16 (MIR16)	1.62	AAH70897
	Phafin	1.75	AAL30770
	Src homology 3 domain protein 2A	1.81	AW555077
Cytoskeleton and vesicle/protein trafficking	Transforming growth factor $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2)	1.89	C86748
	Adducin 3 ( $\gamma$ )	1.59	AW549619
	CgB	1.79	AAH14736
	Gelsolin	1.64	AW548858
	Filamin-like	1.55	AW557788
Miscellaneous	NeuF3	1.67	NM017029
	Mesoderm specific transcript (Mst)	1.88	AW553763
Unknown	Neurogenic extracellular Slit protein (Slit2)	1.62	AAH59267
	EST, no homology	1.56	C76098

RNAs from control and FR50 adrenals were reverse transcribed in the presence of [ $^{33}\text{P}$ ]dCTP and used to hybridize macroarrays containing cDNA probes derived from the National Institute on Aging microarray and SSH-based library (for details, see Ref. 23). Results are expressed in terms of FR50/control ratio, and cutoff is less than 0.7 (down-regulated genes) and more than 1.5 (overexpressed genes). EST, Expressed sequence tagged.

tional at the end of the first postnatal week and are completed by the third postnatal week (28). The development of sympathetic innervation during postnatal life implicates coordinated growth and expansion of nerve endings within the innervated tissue. Indeed, several growth factors produced by chromaffin cells regulate the development and the maintenance of the preganglionic innervation (9, 29, 30). During development of the nervous system, GAP43 promotes axonal pathfinding, neurite outgrowth, and synaptic plasticity (31, 32). It is also required for selective fasciculation to maintain topographic organization of axons (33). During the second postnatal week, the expression of GAP43 in the adrenal medulla decreases to a level comparable with that observed in the adults (12), a phenomenon that corresponds to the establishment of the definitive organization of the medulla. Our microarray data confirmed by RT-PCR indicate that GAP43 mRNA expression was increased in the adrenal glands of FR50 pups and was restricted to the medulla, as shown by *in situ* hybridization experiments. It is thus possible that maternal FR50 somehow alters gene expression in the adrenal medulla, which provokes a remodeling of the structure of chromaffin cells and the distribution of neuronal networks, in weaning pups. The structural changes may in turn trigger a plastic response as a compensatory and/or adaptive reaction to provide an opportunity for aggregation of chromaffin cells and settlement of innervation.

Interestingly, the mRNA expression of Slit2 was also increased in the adrenal medulla of FR50 pups. To our knowledge, this is the first demonstration of Slit2 expression in the rat adrenal medulla. Slit2 belongs to the chemotropic factor superfamily and plays important roles in neuronal, glial, and neural crest cell migration (34–37), as well as in axon elongation/branching (38), acting via Roundabout receptors. In addition, Slits provide repulsive cues to migrating non-neu-

ronal cells (39). High levels of Slit2 mRNA expression in the adrenal medulla of FR50 rats could be involved in the remodeling of chromaffin cell aggregates and/or nerve fiber fasciculation and could account, at least in part, for the structural alterations reported here. Together, morphological alterations and overexpression of genes implicated in morphogenesis and plasticity may reflect a delayed or adaptive settling of chromaffin tissue and innervation.

The question then arises as to whether such alterations of the adrenal medulla structure have physiological and functional consequences. Several studies reported that maternal and neonatal diet restriction retards the functional maturation of chromaffin medullary cells (8, 40). Similarly, IUGR (41) and prenatal exposure to dexamethasone (42) disturb the storage and synthesis capacities of the adrenal gland. However, the impact of maternal FR50 on the adrenal medulla during the perinatal period differs from the effects reported in previous studies. In FR50 rats, TH and PNMT mRNA levels as well as the adrenal content in catecholamines were unaffected. Conversely, maternal undernutrition led to enhanced circulating levels of both E and NE, although the E/NE ratio remained unchanged. However, plasma levels of catecholamines measured in our experimental conditions do not correspond to stress-free baselines or to fully stress-procedure-induced levels but indicate differential nonspecific effect of decapitation between control and FR50 animals. The source of circulating NE may be the adrenal medulla, extraadrenal chromaffin cells, or sympathetic neurons. The proportional relationship between adrenal and circulating E/NE ratio in the two groups indicates that NE levels in plasma is mainly due to production from the adrenal medulla at this stage of development. Together, these data suggest that the rise in plasma catecholamine levels after decapitation is probably due to increased release from the

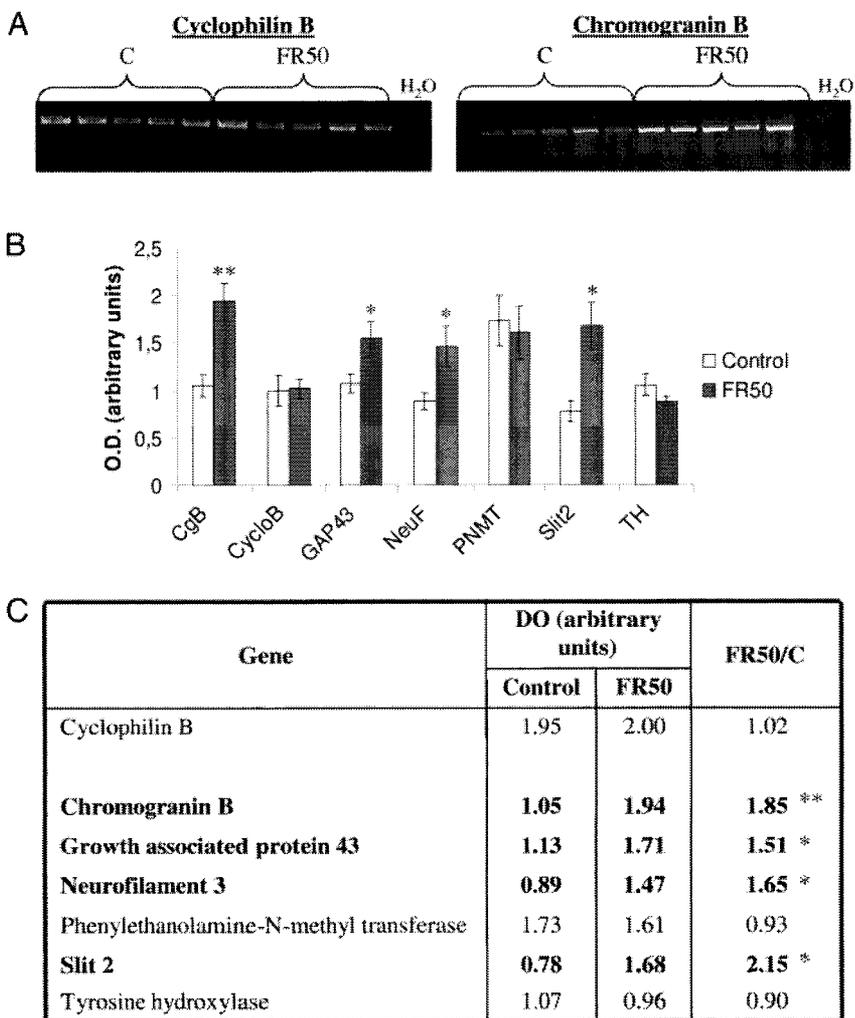


FIG. 4. Levels of mRNA of the selected representative genes quantified by semiquantitative RT-PCR in 21-d-old animals adrenal glands from *ad libitum* [control (C)] and restricted (FR50) fed dams. Each experiment was realized on five animals per group in triplicate, and results were normalized to the expression level of an internal standard (Cyclo B). The results are indicated in B, whereas A shows an example (CgB) of electrophoresis after amplification in semiquantitative conditions. C shows the FR50/control expression ratio. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ , FR50 vs. control.

adrenal gland as a consequence of excessive mobilization of secretory granule stores and/or enhanced granule biogenesis. The increase in CgB mRNA expression in the adrenal medulla of FR50 pups is in agreement with this hypothesis. It has been shown that suppression of CgB expression in

neuroendocrine PC12 cells leads to a reduction in the number of (intrinsic) secretory granules, whereas expression of CgB in non-neuroendocrine cells, which normally do not contain any secretory machinery, led to granules biogenesis (43). In addition, it has been shown that CgB interacts with the 1,4,5-triphosphate receptor/Ca channels (44, 45) and with proteins involved in the formation of fusion complex (46), suggesting that CgB could be involved in  $Ca^{2+}$ -dependent exocytotic processes. Moreover, the expression of  $Ca^{2+}$ -dependent actin-binding proteins such as gelsolin, phafin, or adducin 3, which induce the cytoskeleton remodeling necessary for exocytosis, was also augmented in FR50 adrenals (Table 3). These observations suggest that the adrenal medulla of FR50 pups remains at a high level of activity during postnatal life, probably as a mechanism of specific physiological adaptation to neonatal adverse environment elicited by maternal undernutrition. As reported previously, catecholamine release from neonatal adrenal medulla occurs despite the immaturity of the splanchnic innervation and is under the influence of a non-neurogenic mechanism during the first week of extrauterine life (28). The neurogenic control is fully completed by the end of the third postnatal week. Because the organization of adrenal medulla innervation is altered in

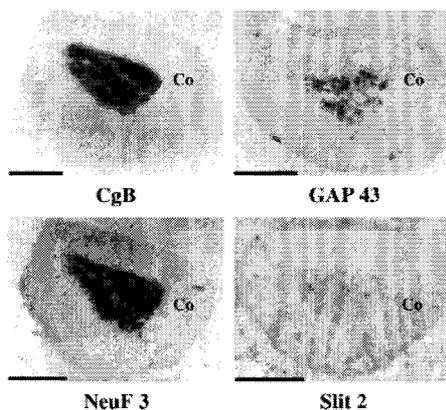


FIG. 5. *In situ* hybridization of selected gene mRNAs in 21-d-old animal adrenal glands from control dams. Experiments were realized on 10 animals per group, and all gave the same results. Scale bars, 1 mm. Co, Adrenal cortex.

FR50 rats at weaning, it is tempting to speculate that the sensitivity of chromaffin cells to the non-neurogenic control could persist in those animals and thus be implicated in the enhanced plasma levels of catecholamines. In addition, neuropeptides produced by the adrenal medulla, such as vasoactive intestinal peptide, neuropeptide Y, and PACAP, can induce CA release via autocrine and/or paracrine mechanisms (9). Interestingly, the mRNA expression of PACAP and its receptor PAC1-R are increased in FR50 adrenals at weaning as assessed by real-time RT-PCR (data not shown).

Recent reports suggested that perinatal life adrenomedullary hyperactivity may have adverse outcomes on cardiovascular and metabolic homeostasis in adulthood, such as high blood pressure and insulin resistance (47–49). Therefore, the alterations observed in FR50 pups could participate to the programming of the metabolic disorders developed by FR50 adult rats (50). It would be important to investigate whether such alterations in the catecholamine status persist in FR50 adult rats and contribute to the pathogenesis of some diseases.

In conclusion, our results based on morphological, functional, and transcriptional analyses demonstrate that maternal perinatal undernutrition markedly alters the processes that take place in the adrenal medulla during postnatal life. Together, these data suggest that maternal nutrient restriction delays and/or irremediably alters the structural and functional maturation of the adrenal gland, which may have pathophysiological consequences.

### Acknowledgments

We thank Dr. Y. Guéraldel and Prof. J. Mazurier (Institut Fédératif de Recherches 118, University of Lille 1, Villeneuve d'Ascq Cedex, France) for providing the HPLC analysis equipment. We are grateful to V. Montel and A. Dickès-Coopman for technical assistance.

Received October 19, 2005. Accepted February 16, 2006.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. Didier Vieau, Unité Propre de Recherche et de l'Enseignement Supérieur Equipe Associée 2701, Laboratoire de Neuroendocrinologie du Développement, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. E-mail: didier.vieau@univ-lille1.fr.

This study was supported by the Lille-Amiens-Rouen-Caen (LARC-Neuroscience) network, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 413, the Conseil Régional de Haute-Normandie, and the Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais.

O.M.-C., L.G., C.L., J.L., E.M., H.G., H.V., Y.A., C.B., and D.V. have nothing to declare.

### References

- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS 1993 Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341:938–941
- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM 1993 Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36:62–67
- Phillips DI 1998 Birth weight and the future development of diabetes. A review of the evidence. *Diabetes Care* 21(Suppl 2):B150–B155
- Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A, Hales CN 1995 Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans* 23:331–335
- Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD 1996 Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* 40:438–443
- Young JB 2002 Programming of sympathoadrenal function. *Trends Endocrinol Metab* 13:381–385
- Matthews SG 2002 Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* 13:373–380
- Young JB 2002 Effects of litter size on sympathetic activity in young adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R1113–R1121
- Schober A, Kriegelstein K, Unsicker K 2000 Molecular cues for the development of adrenal chromaffin cells and their preganglionic innervation. *Eur J Clin Invest* 30(Suppl 3):87–90
- Le Douarin NM, Dupin E 2003 Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* 13:529–536
- Finotto S, Kriegelstein K, Schober A, Deimling F, Lindner K, Bruhl B, Beier K, Metz J, Garcia-Ararras JE, Roig-Lopez JL, Monaghan P, Schmid W, Cole TJ, Kellendonk C, Tronche F, Schutz G, Unsicker K 1999 Analysis of mice carrying targeted mutations of the glucocorticoid receptor gene argues against an essential role of glucocorticoid signalling for generating adrenal chromaffin cells. *Development* 126:2935–2944
- Grant NJ, König F, Aunis D, Langley K 1994 Expression of GAP-43 (neuro-modulin) during the development of the rat adrenal gland. *Brain Res Dev Brain Res* 82:265–276
- Leon C, Grant N, Aunis D, Langley K 1992 L1 cell adhesion molecule is expressed by noradrenergic but not adrenergic chromaffin cells: a possible major role for L1 in adrenal medullary design. *Eur J Neurosci* 4:201–209
- Tischler AS, Ruzicka LA, Donahue SR, DeLellis RA 1989 Chromaffin cell proliferation in the adult rat adrenal medulla. *Int J Dev Neurosci* 7:439–448
- Unsicker K 1993 The chromaffin cell: paradigm in cell, developmental and growth factor biology. *J Anat* 183:207–221
- Leonhardt M, Lesage J, Dufourny L, Dickes-Coopman A, Montel V, Dupouy JP 2002 Perinatal maternal food restriction induces alterations in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and in plasma corticosterone-binding globulin capacity of weaning rat pups. *Neuroendocrinology* 75:45–54
- Lesage J, Dufourny L, Laborie C, Bernet F, Blondeau B, Avril I, Breant B, Dupouy JP 2002 Perinatal malnutrition programs sympathoadrenal and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress in adult male rats. *J Neuroendocrinol* 14:135–143
- Mamet J, Peyronnet J, Roux JC, Perrin D, Cottet-Emard JM, Pequignot JM, Lagercrantz H, Dalmaz Y 2002 Long-term prenatal hypoxia alters maturation of adrenal medulla in rat. *Pediatr Res* 51:207–214
- Coulter CL, McMillen IC, Robinson JS, Owens JA 1998 Placental restriction alters adrenal medullary development in the mid-gestation sheep fetus. *Pediatr Res* 44:656–662
- Manojilovic M, Hristic M, Kalafatic D, Plecas B, Ugresic N 1998 The influence of dexamethasone treatment of pregnant rats on the development of chromaffin tissue in their offspring during the fetal and neonatal period. *J Endocrinol Invest* 21:211–218
- Bernet F, Dedieu JF, Laborie C, Montel V, Dupouy JP 1998 Circulating neuropeptide Y (NPY) and catecholamines in rat under resting and stress conditions. Arguments for extra-adrenal origin of NPY, adrenal and extra-adrenal sources of catecholamines. *Neurosci Lett* 250:45–48
- Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood III WH, Becker KG, Ko MS 2000 Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9127–9132
- Grumolato L, Elkhahoun AG, Ghzili H, Alexandre D, Coulouarn C, Yon L, Salier JP, Eiden LE, Fournier A, Vaudry H, Anouar Y 2003 Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in pheochromocytoma cells reveal pleiotropic effects of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide on cell proliferation, survival, and adhesion. *Endocrinology* 144:2368–2379
- Breton C, Pechoux C, Morel G, Zingg HH 1995 Oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization, regulation, and cellular localization in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 136:2928–2936
- Lesage J, Bernet F, Montel V, Dupouy JP 2001 Morphine-induced stimulation of pituitary-adrenocortical activity is mediated by activation of nitric oxide in the early stages of postnatal life in the rat. *Eur J Endocrinol* 144:441–451
- Lagercrantz H, Bistoletti P 1977 Catecholamine release in the newborn infant at birth. *Pediatr Res* 11:889–893
- Leon C, Grant NJ, Aunis D, Langley K 1992 Expression of cell adhesion molecules and catecholamine synthesizing enzymes in the developing rat adrenal gland. *Brain Res Dev Brain Res* 70:109–121
- Tomlinson A, Coupland RE 1990 The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *J Anat* 169:209–236
- Unsicker K, Kriegelstein K 1996 Growth factors in chromaffin cells. *Prog Neurobiol* 48:307–324
- Schober A, Unsicker K 2001 Growth and neurotrophic factors regulating development and maintenance of sympathetic preganglionic neurons. *Int Rev Cytol* 205:37–76
- Oestreicher AB, De Graan PN, Gispens WH, Verhaagen J, Schrama LH 1997 B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Prog Neurobiol* 53:627–686
- Benowitz LJ, Routtenberg A 1997 GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20:84–91

33. **Shen Y, Mani S, Donovan SL, Schwob JE, Meiri KF** 2002 Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J Neurosci* 22:239–247
34. **Yu TW, Bargmann CI** 2001 Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci* 4(Suppl):1169–1176
35. **de Castro F** 2003 Chemotropic molecules: guides for axonal pathfinding and cell migration during CNS development. *News Physiol Sci* 18:130–136
36. **Hu H** 1999 Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23:703–711
37. **De Bellard ME, Rao Y, Bronner-Fraser M** 2003 Dual function of Slit2 in repulsion and enhanced migration of trunk, but not vagal, neural crest cells. *J Cell Biol* 162:269–279
38. **Ozdinler PH, Erzurumlu RS** 2002 Slit2, a branching-arborization factor for sensory axons in the mammalian CNS. *J Neurosci* 22:4540–4549
39. **Piper M, Georgas K, Yamada T, Little M** 2000 Expression of the vertebrate Slit gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mech Dev* 94:213–217
40. **Lau C, Seidler FJ, Cameron AM, Navarro HA, Bell JM, Bartolome J, Slotkin TA** 1988 Nutritional influences on adrenal chromaffin cell development: comparison with central neurons. *Pediatr Res* 24:583–587
41. **Shaul PW, Cha CJ, Oh W** 1989 Neonatal sympathoadrenal response to acute hypoxia: impairment after experimental intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 25:466–472
42. **Kauffman KS, Seidler FJ, Slotkin TA** 1994 Prenatal dexamethasone exposure causes loss of neonatal hypoxia tolerance: cellular mechanisms. *Pediatr Res* 35:515–522
43. **Huh YH, Jeon SH, Yoo SH** 2003 Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J Biol Chem* 278:40581–40589
44. **Yoo SH, Nam SW, Huh SK, Park SY, Huh YH** 2005 Presence of a nucleoplasmic complex composed of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  channel, chromogranin B, and phospholipids. *Biochemistry* 44:9246–9254
45. **Huh YH, Jeon SH, Yoo JA, Park SY, Yoo SH** 2005 Effects of chromogranin expression on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. *Biochemistry* 44:6122–6132
46. **Yoo SH, You SH, Huh YH** 2005 Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. *FEBS Lett* 579:222–228
47. **Lagercrantz H, Slotkin TA** 1986 The “stress” of being born. *Sci Am* 254:100–107
48. **Huxley RR, Shiell AW, Law CM** 2000 The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens* 18:815–831
49. **Flanagan DE, Vaile JC, Petley GW, Moore VM, Godsland IF, Cockington RA, Robinson JS, Phillips DI** 1999 The autonomic control of heart rate and insulin resistance in young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1263–1267
50. **Garofano A, Czernichow P, Breant B** 1999 Effect of ageing on  $\beta$ -cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia* 42:711–718

*Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

*II.A.1.2. Article 2*

**Résumé :** Un grand nombre de données montre que la malnutrition au cours de la vie précoce programme le développement de maladies chroniques à l'âge adulte. Une grande partie de ces désordres pourrait résulter de l'altération des systèmes neuroendocriniens, tels que l'axe HHS ou le système SSR. Nous avons précédemment montré qu'une restriction alimentaire maternelle de 50% au cours de la gestation tardive et de la lactation réduit le poids des glandes surrénales et altère la différenciation des CC chez le rat mâle au sevrage. Par ailleurs, la dénutrition maternelle modifie l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération et l'apoptose. Cette étude a donc pour but d'étudier l'impact de la restriction alimentaire maternelle sur la croissance des cellules de la médulla au sevrage. Des études histologiques ont permis de montrer que le nombre de cellules en prolifération, dont la présence a été évaluée par un marquage nucléaire au BrdU, est réduit de 45%, tandis que le niveau d'apoptose, déterminé à l'aide de l'immunoréactivité de la caspase-3, est augmenté de 340% chez la descendance FR50. En revanche, la dénutrition maternelle n'affecte pas la prolifération et l'apoptose des cellules corticales chez le rat. De plus, ces changements développementaux sont associés à la surexpression du TGF- $\beta$ 2. Ainsi, ces données indiquent que la dénutrition périnatale altère la balance entre la prolifération et l'apoptose des CC. Ceci pourrait conduire à une programmation inadéquate du développement de la glande médullosurrénale, et contribuer ainsi aux mécanismes pathogéniques des maladies chroniques de l'adulte.

## Maternal perinatal undernutrition impairs chromaffin cells proliferation in the postnatal rat

**Short running title:** Perinatal food restriction and adrenal growth

O. Molendi-Coste\*, J. Mairesse\*, N. Aubert<sup>†</sup>, H. Ghzili<sup>†</sup>, C. Abbadie<sup>††</sup>, H. Vaudry<sup>†</sup>, B. Gonzalez<sup>†††</sup>, Y. Anouar<sup>†</sup>, D. Vieau\*, C. Breton\* and C. Laborie\*

*\*Unité de Neurosciences et Physiologie Adaptatives UPRES-EA 4052, Equipe dénutritions maternelles périnatales, Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

*†INSERM U413, Laboratoire de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire, Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides (IFRMP 23), Université de Rouen, Mont-Saint-Aignan, France*

*††UMR8117 CNRS, Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, Lille, France*

*†††INSERM AVENIR UPRES-EA 2122, Mécanismes et traitements des troubles du développement cérébral, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Rouen, France*

Requests for reprints should be addressed to:

Dr. Christine Laborie,

UPRES-EA 4052, Université Lille 1,

59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

E-mail : Christine.Laborie@univ-lille1.fr

Fax : 33 3 20 33 63 49

Tel : 33 3 20 43 40 73

## ABSTRACT

Numerous data show that malnutrition during early life programs chronic diseases in adulthood. Many of these disorders may result from alterations in neuroendocrine systems development, such as the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and the sympathoadrenal system. We have previously reported that maternal 50% food restriction during late pregnancy and lactation reduces adrenal weight and impairs chromaffin cells differentiation in male rats at weaning. In addition, maternal undernutrition modifies the expression of several genes involved in proliferation and apoptosis. This study therefore investigated the impact of maternal food restriction on the adrenal cells growth in the late postnatal rat. Histological analysis showed that the number of proliferating chromaffin cells assessed by nuclear labelling with BrdU was reduced by 45% whereas the level of apoptosis visualized by caspase-3 immunoreactivity was increased by 340% in adrenal medulla of offspring from undernourished mothers. By contrast, maternal food restriction did not affect proliferation and apoptosis in cortical cells of rats. These developmental changes were associated with overexpression of TGF $\beta$ 2. These data show that perinatal undernutrition impairs the balance between chromaffin cells proliferation and apoptosis. These modifications may lead to “malprogramming” of the adrenal medulla development, what could contribute to the pathogenesis of chronic diseases in adulthood.

**Keywords (5):** chromaffin cells, cell growth, apoptosis, food restriction, programming

## INTRODUCTION

Epidemiological evidence in humans indicates a correlation between intrauterine growth restriction (IUGR) and an increased risk of chronic diseases in adulthood [1, 2]. Animals studies support the hypothesis that maternal undernutrition may program the development of various organs and promotes, at least in part, the appearance of these diseases [3, 4]. Although the mechanisms of perinatal programming are still to be elucidated, most studies have focused on the implication of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) neuroendocrine alterations and glucocorticoids production [5-7]. Nevertheless, the sympathoadrenal (SA) system and the adrenomedullary chromaffin cells are particularly sensitive to perinatal nutritional status [8, 9] and participate to stress adaptation, particularly through regulation of cardiovascular activity and energetic metabolism.

We have previously shown that maternal 50% food restriction (FR50) leads to adrenal atrophy and disturbs the development and the activity of HPA axis [10, 11]. Recently, we demonstrated that FR50 also leads to adrenal medulla alterations in male rat at weaning [12]. Using macroarrays, we have identified several genes whose expression was affected by maternal nutrient restriction [12]. A majority of genes differentially expressed between adrenal gland of FR50 and control rats are involved in neuroendocrine differentiation, proliferation and cell survival. Among these genes, transforming growth factor beta 2 (TGF $\beta$ 2), a member of the TGF $\beta$  family of growth factors was highly expressed in the adrenal gland of FR50 rats and was shown, *in vivo*, to be the only inhibitor of chromaffin cells (CC) proliferation identified to date. Indeed, mice deficient for TGF $\beta$ 2 display a significant increase in the total number of CC in late fetal life [13]. In addition, maternal perinatal undernutrition increases the expression of Expi and PLAG2,

two genes that influence apoptosis and cell proliferation [14, 15]. However, to our knowledge, the role of these two genes on the adrenal cell death has not been reported, so far.

This study aimed at determining the effects of maternal perinatal undernutrition on the proliferation and apoptosis of adrenomedullary cells in 21-day-old male rats.

## **MATERIAL and METHODS**

### **Animals and regimen**

Female (250-300g) Wistar rats (Charles Rivers Laboratories) were maintained under controlled conditions and had free access to tap water and food rat chow. They were time mated with a male for 1 night. Day 0 of pregnancy was defined if spermatozoa were found in vaginal smears. Pregnant females (n = 17) were assigned randomly to either control or FR50 group. Maternal food restriction (50% of *ad libitum* intake) was established from embryonic day 14 until postnatal day 21 (P21) [10]. Experiments were processed only on males and conducted in accordance with the European Communication Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Animals use accreditation by the French Ministry of Agriculture (No. 04860).

### **BrdU labelling and identification of BrdU-positive cells**

At P20, rats received one intraperitoneal injection of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; 100 mg/kg). At P21, animals were killed following intracardiac perfusion with 15 mL of 0.9% NaCl and 45 mL of 4% paraformaldehyde. Left adrenals were cut in frontal 40- $\mu$ m-thick sections and free floating sections were incubated successively in 2N HCl, 2% normal donkey serum and with mouse anti-BrdU antibody (Roche Diagnostics). Biotinylated anti-mouse secondary antibody staining (Chemicon International) was amplified with the ABC kit (Vector Laboratories) and

developed using diaminobenzidine. Right adrenals were cryoprotected and frozen on dry ice. Serial 8  $\mu\text{m}$ -thick sections were prepared on SuperFrostPlus slides and treated with 2N HCl then incubated with mouse anti-BrdU, rabbit anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH, Jacques Boy Institute) and sheep anti-phenylethanolamine-N-methyl-transferase (anti-PNMT, Chemicon International) antibodies. The sections were incubated with a mixture of fluorescent secondary antibodies (Jackson Immuno Research). Two median largest sections per adrenal were analysed (n=5 from 4 dams).

### **Caspase-3 activity measurement by immunohistochemistry**

Adrenal frozen medial sections of 12  $\mu\text{m}$ -thicks were pre-treated to inactivate endogenous peroxydases and incubated with a polyclonal rabbit antibody against cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technologies). Biotinylated anti-rabbit secondary antibody (Chemicon International) staining was amplified as reported above. Two median largest sections per adrenal (n=5 from 4 dams) were analysed.

### **Caspase-3 activity measurement by fluorimetric assay**

Adrenal (n = 3 from 3 dams) frozen medial sections of 12  $\mu\text{m}$ -thick (6 per slide) were detached and dissociated in PBS at 4°C. Cells were harvested by centrifugation (350 x g, 4°C, 10 min) and treated with a quantitative fluorometric caspase assay system (Promega) with Ac-DEVD-AMC as caspase-3 substrate accordingly to the manufacturer's instructions. The fluorescence intensity was measured with a Bio-Tek FL600 fluorescence microplate reader.

**RT-PCR**

Total RNAs were purified from adrenals (n = 5 from 4 dams) using the TRIzol reagent (Gibco BRL) accordingly to the manufacturer's instructions. The semi-quantitative RT-PCR method used here has been described and validated previously [16]. Primers were designed to amplify a 473-bp fragment of the TGFβ2 cDNA (encoding to residues 28-186, accession number AF153013), a 489-bp fragment of TGFβ receptor 2 (TβR2) cDNA (residues 70-233, accession number S67770) and a 456-fragment of the cyclophilin B cDNA (residues 45-197, accession number AF071225) used as an internal standard. After amplification, samples were resolved on agarose, stained by ethidium bromide and quantified with a Biorad GS-700 densitometer (Biorad Laboratories).

**Expression of results and statistics**

The number of stained cells was reported to the total of area section. Results are expressed as percentage of control values. Adrenal areas were determined using the MultiAnalyst image analyser (v 1.1, Biorad Laboratories). All data are expressed as mean ± SEM. Statistical analyses were performed using the unpaired Student's *t*-test and the SigmaStat software. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

**RESULTS****Determination of adrenal cell proliferation with BrdU labelling**

Adrenal cells proliferation was assessed using *in vivo* incorporation of BrdU in cells traversing S phase of the cell cycle. Cells that have incorporated BrdU in the adrenal cortex were similar in both control (Fig 1C) and FR50 (Fig 1D) rats. By contrast, the number of

adrenomedullary cells stained for BrdU was significantly reduced in FR50 rats (Fig 1F) compared to control ones (Fig 1E). Also, the index of adrenomedullary cells labelled with BrdU was reduced by 45% in FR50 adrenal medulla (Fig 2A). In an attempt to identify the phenotype of adrenomedullary cells that have incorporated BrdU, triple staining for BrdU, TH and PNMT was performed. TH was used as a marker for both adrenergic and noradrenergic CC while PNMT distinguishes adrenaline producing cells. TH and PNMT labelled cells numbers were reduced by 32% and 37 % respectively in FR50 adrenals (Fig 2B).

### **Determination of adrenal cell death**

The number of apoptotic cells was first determined by the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated d-UTP nick-end labelling (TUNEL) method. In FR50 rats, the incidence of apoptosis of adrenomedullary cells was markedly increased compared to control animals ( $100 \pm 32$  % in controls vs  $227 \pm 37$  % in FR50,  $p < 0.05$ , data not shown), whereas it is similar in the cortical cells ( $100 \pm 13$  % in controls vs  $149 \pm 33$  % in FR50, data not shown). We also examined the occurrence of apoptosis by searching for caspase-3 activity by immunohistochemistry with an antibody specific for the active cleaved form of caspase-3. As shown in Fig 3, caspase-3 immunoreactive cells were mainly observed in the core of the medulla in both groups. In contrast, caspase 3 immunoreactivity was not observed in the adrenal cortex at this stage (Fig 3). In FR50 adrenals, the incidence of apoptosis of adrenomedullary cells was three times higher than in controls (Fig 3C). In addition, caspase-3 activity measured in the whole adrenal gland with a quantitative assay using a fluorogenic peptidic caspase-3 substrate was increased by 15% in FR50 adrenals (Fig 3D).

### Analysis of TGF $\beta$ 2 and T $\beta$ R2 expression

In agreement with macroarray analysis, TGF $\beta$ 2 mRNA expression was increased by 140% in FR50 compared to control adrenals (Fig 4). In contrast, the slight increase noted in the expression of T $\beta$ R2 in FR50 adrenals was not statistically significant (Fig 4). Experiments were performed in triplicate and gave similar results.

## DISCUSSION

This study demonstrates that maternal perinatal undernutrition alters proliferation/apoptosis balance in the adrenal medulla of the male offspring at weaning.

In FR50 adrenals, reduced BrdU positive cells number was observed in adrenomedullary cells but not in cortical cells. This data is consistent with the adrenal atrophy previously reported in FR50 rats at weaning [10, 12]. However, the mass loss of the adrenal affected to the same extent the medulla and the cortex. This suggests that maternal undernutrition could impair the proliferation of adrenal during different stages of development. Indeed, the proliferation of cortical cells occurs mainly during fetal and neonatal life whereas CC are able to proliferate after birth [17, 18]. In the medulla, the impaired proliferation affected to the same extent adrenergic and noradrenergic chromaffin cells. Proliferation of adrenal CC is controlled by specific interactions among neurogenic and hormonal signals [19, 20]. Among these factors, TGF $\beta$  isoforms and particularly TGF $\beta$ 2 are thought to be important paracrine factors controlling CC proliferation *in vivo* [13]. As previously reported using a macroarray approach, semi-quantitative RT-PCR experiments confirmed the increased mRNA levels of TGF $\beta$ 2 in the adrenal from FR50 pups. As expected, the TGF $\beta$ 2 mRNA expression was restricted to the adrenal cortex (data not shown). TGF $\beta$ 2 acts through a receptor complex consisting of a ligand binding T $\beta$ R2 and T $\beta$ R1 present in

both cortical and chromaffin cells [21]. We demonstrated that adrenal T $\beta$ R2 mRNA expression was unaffected in FR50 rats. Thus, we speculate that the alteration observed in FR50 CC proliferation might be dependent of TGF $\beta$  signalling. In a previous study, we reported that several genes up-regulated in FR50 adrenals were associated with apoptosis [12] suggesting that cell survival could be impaired by maternal perinatal undernutrition. Caspase-3, that plays essential roles in programmed cell death, is constitutionally expressed in mammalian cells as zymogen and requires cleavage for activation [22]. In FR50 adrenals, caspase-3 activity as well as immunoreactive cells for active caspase-3 in medulla were both increased. However, the proportion of caspase-3 immunoreactive cells in adrenal medulla was increased by 340% whereas the augmentation of caspase 3 activity evaluated in the whole adrenal gland was limited to 15%. This discrepancy indicates that apoptosis occurs mainly throughout CC which is corroborated by the absence of caspase 3 immunoreactivity in adrenal cortex (data not shown). However, we can not exclude that caspase 3 endogenous inhibitors may also contribute to the discrepancy observed between immunostaining and activity. In this line, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) has also been shown to inhibit caspase 3 activity and protect against apoptosis [23, 24]. Interestingly, the mRNA expression of PACAP type 1 receptor (PAC1-R) was increased in the adrenal medulla of FR50 pups (data not shown).

In conclusion, we demonstrated that maternal perinatal food restriction markedly alters the balance between CC proliferation and apoptosis in the adrenal medulla from male rats at weaning. Considering that the regulation of cell mass is of prior importance for organs homeostasis, our data suggest that impaired adrenal medulla growth may lead to altered adrenal function and contribute to the development of chronic disorders in adulthood.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. J. Mazurier (IFR 118, University of Lille 1, France) and Gilles Courtand (CCMIC, University of Lille 1, France) for providing access to the microscope facilities. This study was supported by the Lille-Amiens-Rouen-Caen (LARC-Neurosciences) network, the Conseil Régional de Haute-Normandie and the Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais.

### List of references

1. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993; 341: 938-941.
2. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension* 2006; 47: 502-508.
3. Breant B, Gesina E, Blondeau B. Nutrition, glucocorticoids and pancreas development. *Horm Res* 2006; 65 Suppl 3: 98-104.
4. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 1224-1232.
5. Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol* 2006; 572: 31-44.
6. Lesage J, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, Vieau D. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 2006; 9: 183-198.
7. Vieau D, Sebaai N, Léonhart M, Dutriez-Casteloot I, Molendi-Coste O, Laborie C, Breton C, Deloof S, Lesage J. HPA axis programming maternal undernutrition in the male offspring. *Psychoneuroendocrinology* 2007 (in press).
8. Phillips DI. Fetal programming of the neuroendocrine response to stress: links between low birth weight and the metabolic syndrome. *Endocr Res* 2004; 30: 819-826.

9. Young JB. Programming of sympathoadrenal function. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 381-385.
10. Leonhardt M, Lesage J, Dufourny L, Dickes-Coopman A, Montel V, Dupouy JP. Perinatal maternal food restriction induces alterations in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and in plasma corticosterone-binding globulin capacity of weaning rat pups. *Neuroendocrinology* 2002; 75: 45-54.
11. Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 2001; 142: 1692-1702.
12. Molendi-Coste O, Grumolato L, Laborie C, Lesage J, Maubert E, Ghzili H, Vaudry H, Anouar Y, Breton C, Vieau D. Maternal perinatal undernutrition alters neuronal and neuroendocrine differentiation in the rat adrenal medulla at weaning. *Endocrinology* 2006; 147: 3050-3059.
13. Rahhal B, Dunker N, Combs S, Krieglstein K. Isoform-specific role of transforming growth factor-beta2 in the regulation of proliferation and differentiation of murine adrenal chromaffin cells in vivo. *J Neurosci Res* 2004; 78: 493-498.
14. Jung DJ, Bong JJ, Baik M. Extracellular proteinase inhibitor-accelerated apoptosis is associated with B cell activating factor in mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 2004; 292: 115-122.
15. Declercq J, Hensen K, Van De Ven WJ, Chavez M. PLAG proteins : how they influence apoptosis and cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 264-265.
16. Breton C, Pechoux C, Morel G, Zingg HH. Oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization, regulation, and cellular localization in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 1995; 136: 2928-2936.
17. Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y. Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology* 1999; 140: 3342-3353.
18. Unsicker K. The chromaffin cell: paradigm in cell, developmental and growth factor biology. *J Anat* 1993; 183:207-222.
19. Coupland RE, Tomlinson A. The development and maturation of adrenal medullary chromaffin cells of the rat in vivo: a descriptive and quantitative study. *Int J Dev Neurosci* 1989; 7:419-438.
20. Schober A, Krieglstein K, Unsicker K. Molecular cues for the development of adrenal chromaffin cells and their preganglionic innervation. *Eur J Clin Invest* 2000; 30 Suppl 3: 87-90.
21. Forander P, Krieglstein K, Soderstrom S, Stromberg I. Mutual induction of TGFbeta 1 and NGF after treatment with NGF or TGFbeta 1 in grafted chromaffin cells of the adrenal medulla. *Exp Neurol* 2000; 164: 303-313.

22. Degtrev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; 22: 8543-8567.
23. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H. The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of CED3-related cysteine protease caspase-3/ CPP32. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13390-13395.
24. Vaudry D, Cottet-Rousselle C, Basille M, Falluel-morel A, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits caspase-3 activity but does not protect cerebellar granule neurons against beta-amyloid (25-35)-induced apoptosis. *Regul Pept* 2004; 123: 43-49.

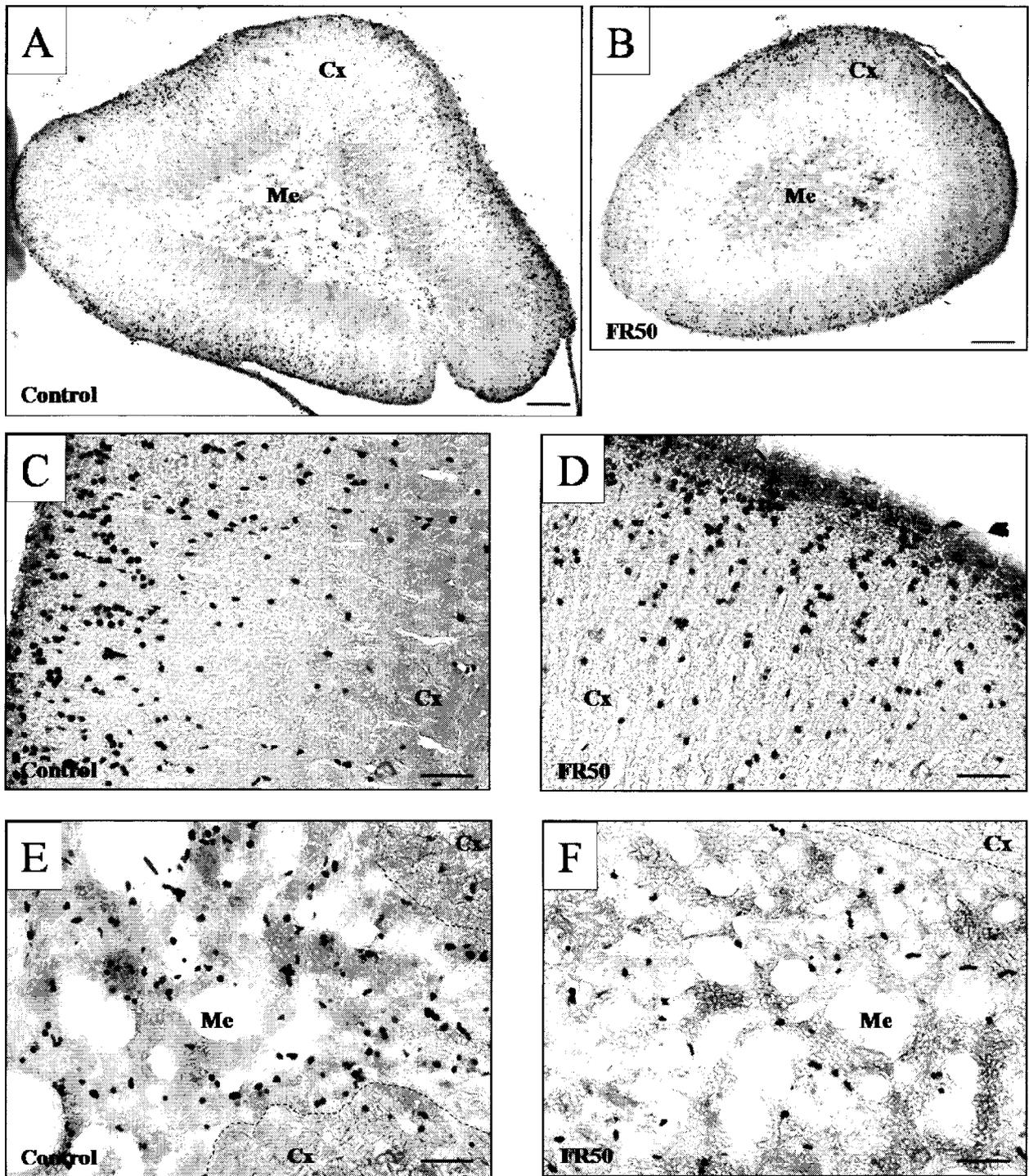


Figure 1, Molendi-Coste *et al*

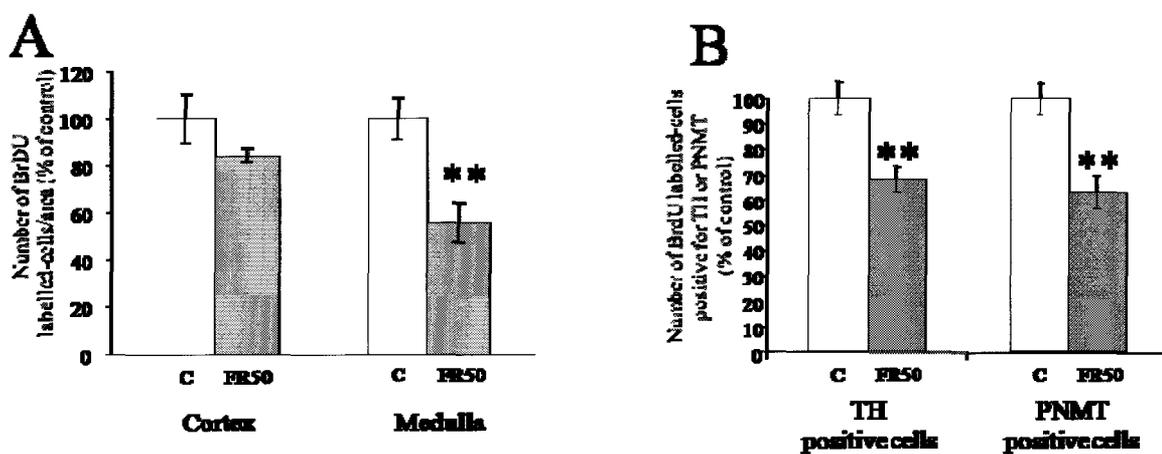


Figure 2, Molendi-Coste *et al*

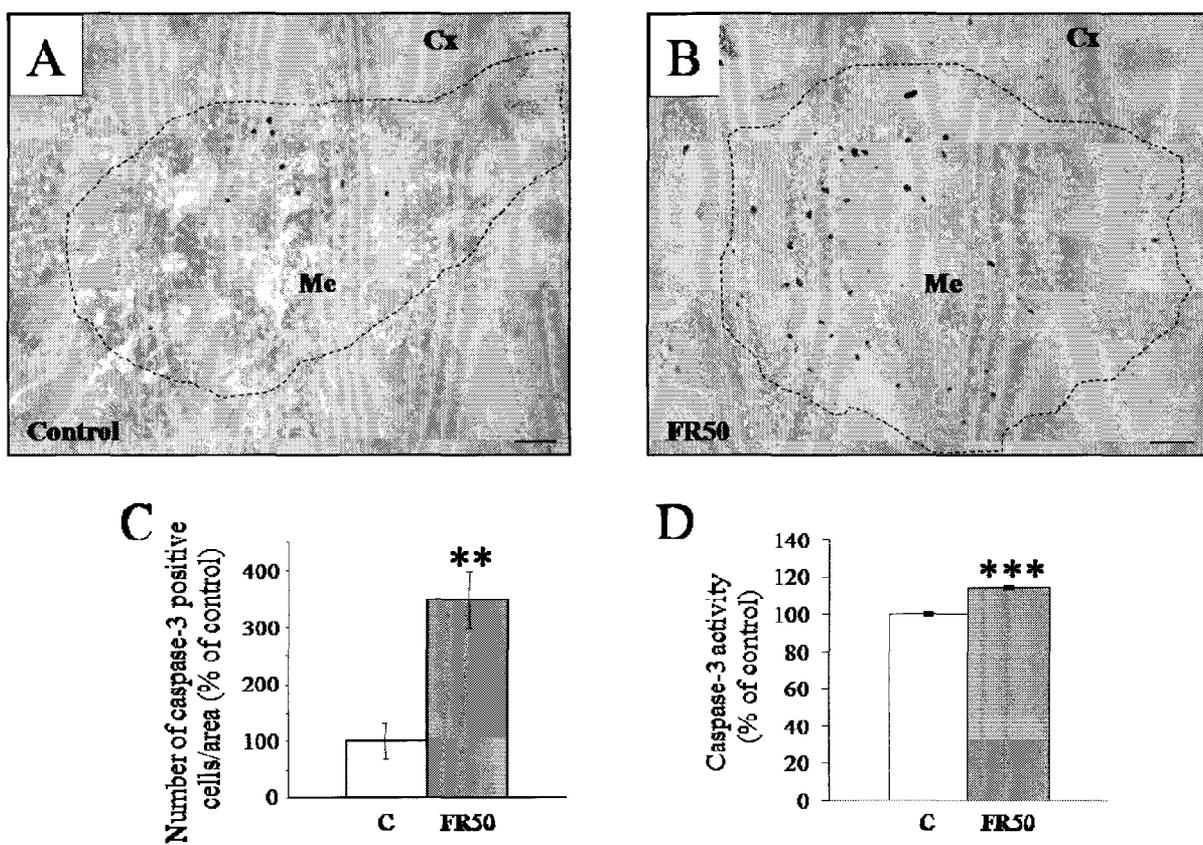
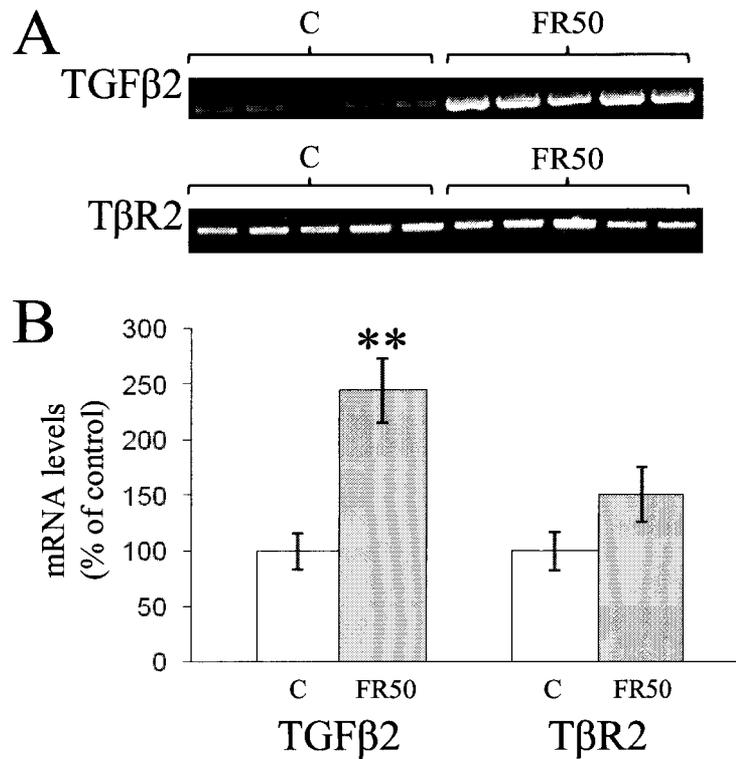


Figure 3, Molendi-Coste *et al*

Figure 4, Molendi-Coste *et al.*

## LEGENDS

**Figure 1:** Proliferation of adrenal cells in 21-day-old rats. A and B: immunolabelling for BrdU (dark nuclei) in the adrenals from control (A) and FR50 (B) animals; C and D: BrdU-labelled cells in the adrenal cortex from control (C) and FR50 animals (D); E and F: BrdU-labelled cells in the medulla from control (E) and FR50 (F) animals. Negative controls did not exhibit any specific staining (not shown). Magnification bars 300  $\mu\text{m}$  (A and B) and 100  $\mu\text{m}$  (C - F). Cx: cortex; Me: medulla. Medulla was delimited by dotted lines (E and F).

Figure 2: BrdU labelled cells in controls (open bars) and FR50 (shaded bars). A: Number of BrdU labelled cells in the adrenal cortex and medulla related to the area section investigated. B: Number of CC (TH- positive cells) and adrenergic (PNMT- positive cells) BrdU-labelled cells in the adrenal medulla. Results are means  $\pm$  SEM and are expressed as percentages of control values (n=5 pups from 4 dams), \*\*  $p < 0.01$  FR50 vs controls.

Figure 3: Apoptosis within the adrenals from 21-day-old rats. A and B: immunohistochemistry for cleaved caspase-3 (dark cells) in the adrenals from control (A) and FR50 (B) animals. C: number of cells immunoreactive for active caspase-3 related to the adrenal medulla area in control (open bars) and FR50 (shaded bars) animals (n=5 pups from 4 dams). D: caspase-3 activity in the adrenal from control (open bars) and FR50 (shaded bars) animals (n=3 pups from 3 dams). Results are means  $\pm$  SEM and are expressed as percentages of control values, \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  FR50 vs. control. Magnification bars = 100  $\mu$ m. Cx: cortex; Me: medulla. Medulla was surrounded by dotted lines.

Figure 4: Expression of TGF $\beta$ 2 and T $\beta$ R2 mRNAs quantified by semi-quantitative RT-PCR in the adrenal glands from control (C) and FR50 21-day-old rats. A: example of electrophoresis after amplification in semiquantitative conditions. B: levels of TGF $\beta$ 2 and T $\beta$ R2 mRNAs in control (open bars) and FR50 (shaded bars) animals. Cyclophilin B was used as an internal standard for equal amplification. Results are means  $\pm$  SEM and are expressed as percentages of control values (n=5 pups from 4 dams), \*\*  $p < 0.01$  FR50 vs. control.

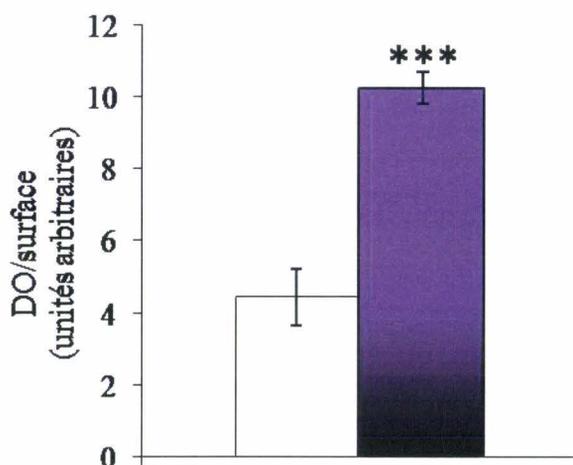
#### II.A.2. Résultats complémentaires et discussion

Ainsi, une dénutrition maternelle de 50 % au cours de la dernière semaine de gestation et de la lactation induit, au terme de la restriction alimentaire, c'est-à-dire au sevrage, des modifications majeures dans la différenciation et la prolifération des CC. Ces altérations dans le développement des CC s'accompagnent d'une hyperactivité de la glande médullosurrénale dans des conditions de repos, et résulte en une profonde perturbation de l'homéostasie de la glande médullosurrénale chez le rat mâle. Ces résultats sont en adéquation avec les études épidémiologiques récentes qui décrivent une hyperactivité du système SSR chez des enfants ayant présenté un RCIU (Fernald and Grantham-McGregor, 2002; Johansson *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2007; Phillips and Jones, 2006). Ainsi, en plus de reproduire des modifications de l'activité de l'axe corticotrope communément observées en épidémiologie (Vieau *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2006; Phillips, 2007), le modèle FR50 fournit une base expérimentale à l'étude des altérations de l'activité du système SSR, et de leurs possibles implications dans la programmation.

##### II.A.2.1. *Modifications de l'innervation préganglionnaire cholinergique*

Compte tenu de l'influence primordiale de l'innervation sympathique sur la régulation de l'activité des CC (paragraphe II.A.2.1.), nous avons vérifié l'intégrité de l'organisation des fibres nerveuses (Molendi-Coste *et al.*, 2006) ainsi que leur activité dans la médulla des animaux FR50 au sevrage (figure 19). Comme nous l'avons décrit, la fasciculation des fibres nerveuses intramédullaires (marquées au GAP-43) est réduite suite à la dénutrition périnatale, tandis que le nombre de faisceaux est augmenté, ce qui aboutit à une densité moyenne de fibres comparable entre les surrénales témoins et FR50. Après avoir mis en évidence de telles modifications morphologiques, il était nécessaire d'évaluer l'intensité de l'innervation des CC par les fibres sympathique préganglionnaires, qui, rappelons le, sont de nature cholinergique. Dans ce but, nous avons réalisé un marquage semi-quantitatif par colorimétrie de l'activité de l'enzyme impliquée dans l'inactivation de l'acétylcholine et dont l'activité reflète la densité des influx nerveux préganglionnaire, l'AChE (Karnovsky and Roots, 1964). L'activité de cette enzyme est augmentée d'un facteur supérieur à 2 dans la médulla des animaux FR50 comparativement aux animaux témoins (figure 19), ce qui suggère une intensification de l'innervation sympathique des CC. Nous avons suggéré dans notre premier article que la stimulation non-neurogénique de la sécrétion des catécholamines puisse persister au sevrage, et aboutir à une hyperactivité de la médullosurrénale au repos (Molendi-Coste *et al.*, 2006). Cependant, au regard de ces nouveaux résultats, et compte tenu que la stimulation de la sécrétion des catécholamines par les CC est quasi-exclusivement sous

contrôle nerveux dès le milieu de la deuxième semaine de vie postnatale (Slotkin *et al.*, 1994; Tomlinson and Coupland, 1990), il est probable que l'intensification des influx nerveux sympathiques mise en évidence puisse également et partiellement être à l'origine de l'hyperactivité de la médullosurrénale chez les animaux FR50 au sevrage.

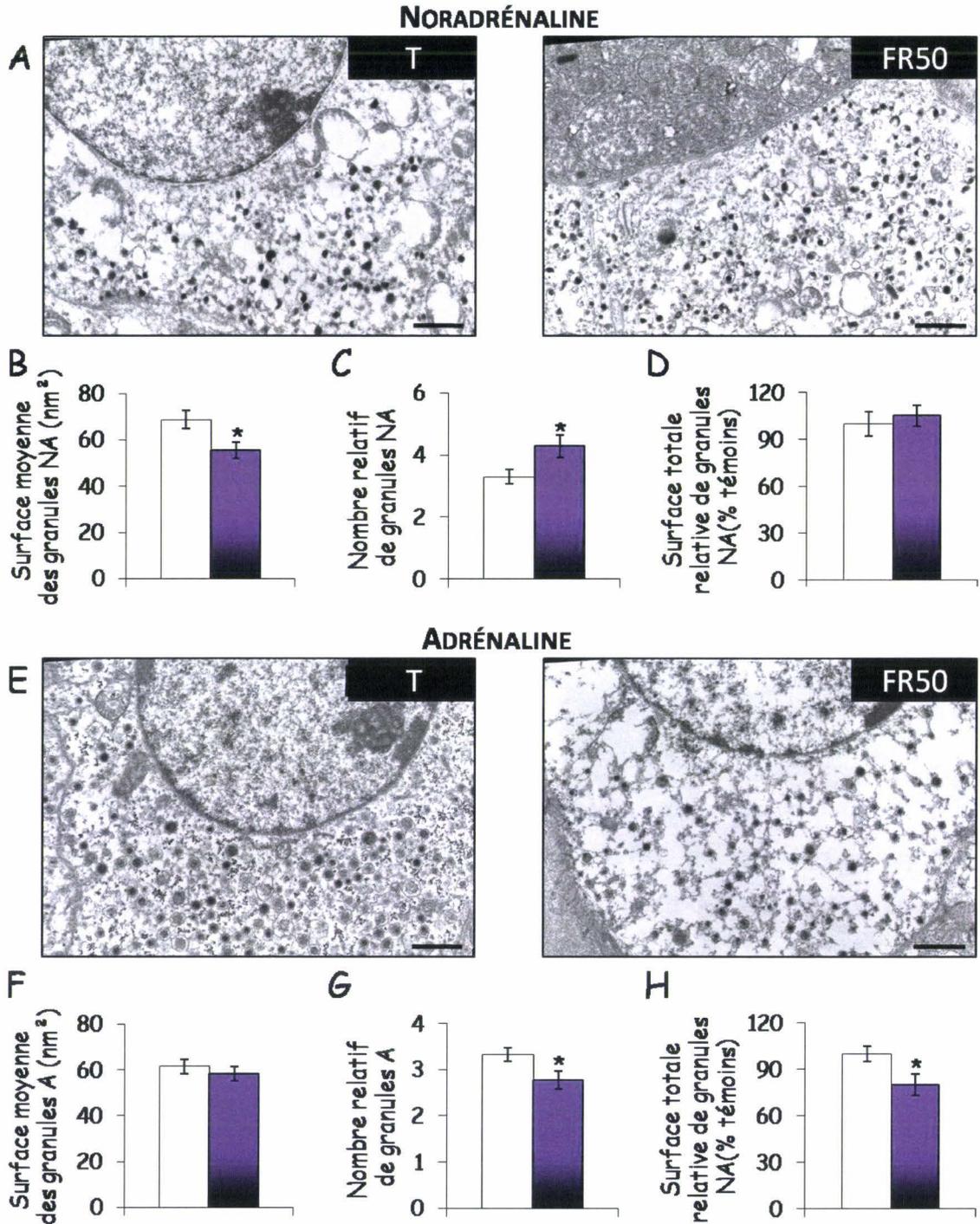


**Figure 19** : *Activité acétylcholine estérase dans la médullosurrénale au sevrage.* La densité optique de la coloration au nitrate d'argent a été rapportée à la surface de la médulla analysée chez les animaux témoins (colonne vide) et FR50 (colonne pleine). \*\*\*,  $p < 0,001$  témoins vs. FR50

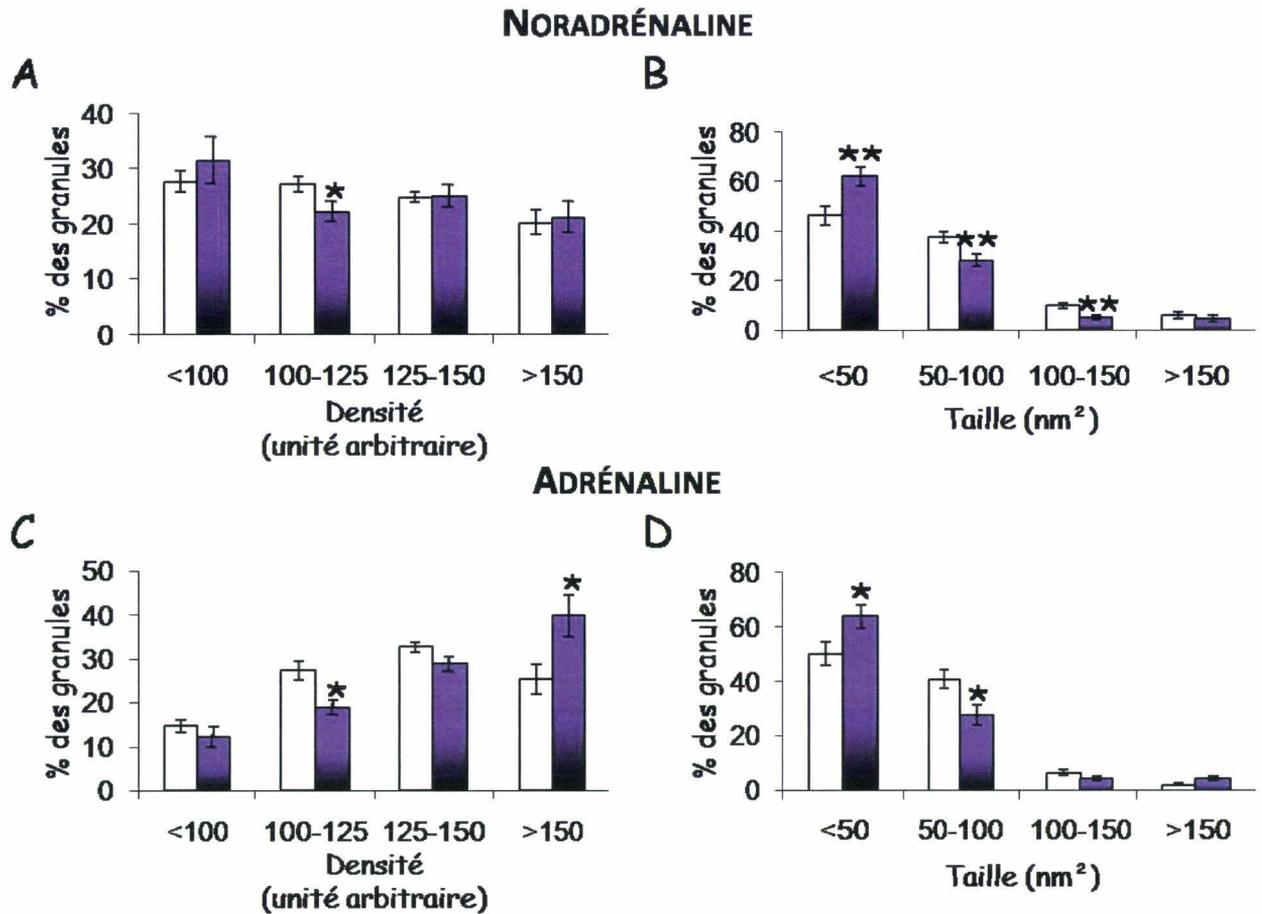
#### II.A.2.2. Modifications de l'ultrastructure des granules de sécrétion des cellules chromaffines

Dans les CC, les catécholamines sont stockées et compartimentées dans des granules de sécrétion à cœur dense, dont le système membranaire prend classiquement origine au niveau du réseau trans-golgien et du réticulum endoplasmique (Coupland, 1965). Les catécholamines sont sécrétées à la fois en conditions basales et en réponse à une stimulation, majoritairement nerveuse chez l'adulte (Tomlinson and Coupland, 1990). Bien que les granules chromaffines semblent participer à la fois à la voie constitutive et régulée de sécrétion, la compréhension ainsi que l'identification morphologique des spécificités de chacune de ces deux voies sont encore loin d'être univoques. Quoi qu'il en soit, il est reconnu de longue date que la sécrétion des catécholamines dans la lumière intercellulaire par les CC de la glande surrénale est réalisée par exocytose (Coupland, 1965). Néanmoins, il a récemment été proposé que la sécrétion puisse avoir principalement lieu via une voie fragmentaire de sécrétion, qui implique l'acheminement du contenu des granules chromaffines vers la membrane par l'émission de vésicules de sécrétion (Crivellato *et al.*, 2003; Crivellato *et al.*, 2004; Crivellato *et al.*, 2006b). Ce processus semblerait même être conservé au cours de l'évolution (Crivellato *et al.*, 2006a). Néanmoins, l'étude de la morphologie des granules de sécrétion renseigne déjà, au moins en partie, sur l'intégrité de leur(s) voie(s) de biosynthèse et de sécrétion.

Ainsi, afin d'approfondir l'étude des effets de la dénutrition maternelle périnatale sur l'activité des CC, nous avons entrepris d'analyser l'ultrastructure des granules de sécrétion des CC des deux phénotypes en microscopie électronique (figures 19 et 20), en collaboration avec le professeur Frank Vandebulcke du laboratoire d'écologie numérique et écotoxicologie (UPRES-EA 3570, Université des Sciences et Technologies de Lille) et le docteur Loïc Brunet du CCMIC (Centre Commun d'Imagerie Mesures Cellulaires, Université des Sciences et Technologies de Lille). La dénutrition périnatale entraîne une réduction de la taille moyenne des granules NA, qui semble être compensée par une augmentation de leur nombre, aboutissant, au final, à une surface totale de granules comparable entre les animaux témoins et FR50 (figure 20). A l'inverse, la taille moyenne des granules A n'est pas modifiée tandis que leur nombre est diminué. De ce fait, la surface totale relative des granules est réduite dans les CC A. Si l'on considère à présent la répartition des granules de sécrétion en fonction de leur densité et de leur taille (figure 21), nous observons une réduction de la proportion des granules de densité moyenne (100-125) dans les CC NA et A, et une augmentation de la fraction de granules à forte densité (>150) uniquement dans les CC A (figure 21C). Ces données suggèrent que la dénutrition maternelle périnatale favorise la formation de granules à forte densité dans les CC A, alors qu'elle semble rediriger les granules NA vers des densités plus faibles. De la même manière, la répartition des granules en fonction de leur taille est différente entre les deux types de CC chez les animaux FR50. En effet, nous observons une réduction de la fraction des granules de surface moyenne (100-150 nm<sup>2</sup>) et une grande augmentation de la proportion des granules de petite taille (< 50nm<sup>2</sup>) dans les CC NA et A, tandis que seule les CC NA présentent une réduction de la fraction des granules de taille moyenne à faible (50-100 nm<sup>2</sup>). Ainsi, la dénutrition périnatale affecte de façon différentielle la machinerie de sécrétion des deux phénotypes de CC chez les animaux FR50 au sevrage.



**Figure 20 :** Ultrastructure des granules chromaffines au sevrage. A et E : photographies prises en microscopie électronique ( $\times 10\,000$ ) de CC NA (A) et A (E) chez des animaux témoins et FR50. B et F : diagrammes présentant la surface moyenne (nm<sup>2</sup>) des granules chromaffines NA (B) et A (F) chez des animaux témoins (colonnes vides) et FR50 (colonnes pleines). C et G : diagrammes présentant le nombre de granules chromaffines NA (C) et A (G) relatif à la surface de cellule mesurée (unités arbitraires) chez des animaux témoins (colonnes vides) et FR50 (colonnes pleines). D et H : diagrammes présentant la surface totale relative représentée par les granules NA (D) et A (H). \*,  $p < 0,05$  témoins vs. FR50. Barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$



**Figure 21 :** Répartition des granules chromaffines issues d'animaux au sevrage en fonction de leur surface et de leur densité. A et C : diagrammes présentant la répartition (%) des granules chromaffines NA (A) et A (C) en fonction de leur densité chez les animaux témoins (colonne vides) et FR50 (colonne pleines). B et D : diagrammes présentant la répartition (%) des granules chromaffines NA (B) et A (D) en fonction de leur taille. \*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,01$  témoins vs. FR50

Un certain nombre de facteurs impliqués dans la biosynthèse des granules de sécrétion, telles que les chromogranines et les glucocorticoïdes, pourraient participer à expliquer les résultats obtenus chez les animaux FR50. Comme nous l'avons déjà noté (Molendi-Coste *et al.*, 2006), la surexpression de la CgB mise en évidence dans la médulla des animaux FR50 par l'utilisation de «macroarray», et confirmée par RT-PCR semi-quantitative et hybridation *in situ* (figure 22A et B) laissait déjà suspecter des altérations de la machinerie de sécrétion. En effet, les chromogranines (Cg) A et B appartiennent à la famille des granines, qui comprend plusieurs membres et dont les rôles ne sont pas totalement élucidés. Néanmoins, les Cg semblent être des facteurs essentiels de la machinerie de synthèse des granules à cœur dense puisqu'elles permettent l'agglomération des

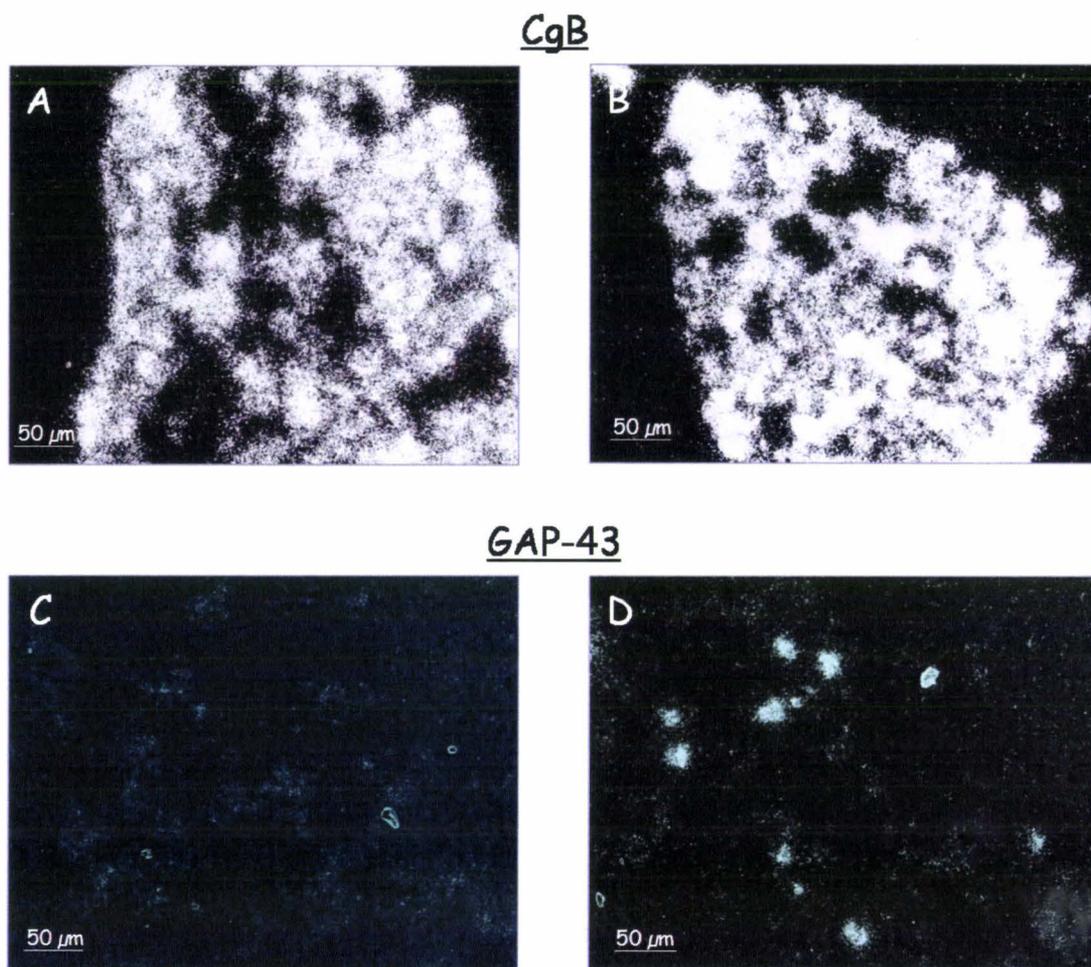
composants de la matrice de ces granules, dont les catécholamines (Yoo, 1995; Yoo, 1996; Yoo and Lewis, 1996). Bien qu'il ait été démontré que l'expression de la CgA par des lignées cellulaires endocrines, telles que les cellules PC12, constitue un interrupteur « on/off » de la machinerie de sécrétion (Kim *et al.*, 2001), des études similaires ont mis en évidence l'importance encore plus marquée de l'expression de la CgB (Huh *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001). Les données disponibles *in vivo* sont cependant contradictoires en apparence. En effet, il a été décrit, d'une part, que l'expression constitutive d'ARN anti-sens de la CgA entraîne une réduction majeure de la biosynthèse des granules chromaffines chez la souris (Kim *et al.*, 2005). D'autre part, les souris portant une invalidation du gène de la CgA ne présentent aucune altération des granules chromaffines, ce qui, bien qu'en apparence opposition avec le rôle permissif de la CgA dans la biosynthèse des granules de sécrétion, semble plutôt indiquer que la surexpression de la CgB ainsi que de la sécrétogranine-II observées chez ces mêmes animaux pourrait compenser l'absence de CgA (Hendy *et al.*, 2006). De telles données ne sont malheureusement pas disponibles concernant la CgB. Par ailleurs, les CgA et B interagissent avec la syntaxine-A, et, de ce fait, participeraient activement à la formation du complexe de fusion membranaire (Yoo *et al.*, 2005). Au regard des résultats obtenus en microscopie électronique, la surexpression de la CgB observée chez les animaux FR50 pourrait constituer un des mécanismes géniques à l'origine des modifications de la machinerie de sécrétion des CC et de leur hyperactivité. A l'inverse, la surexpression de ce gène pourrait intervenir en aval des altérations des granules chromaffines et représenter un mécanisme induit ou compensatoire. Par ailleurs, l'expression de la CgB par les CC semble être indépendante de l'innervation splanchnique ainsi que de la fonctionnalité de l'axe HHS chez le rat (Fischer-Colbrie *et al.*, 1988). Sa surexpression chez les animaux FR50 n'est donc imputable ni à l'augmentation de l'activité AChE, ni à celle des taux de glucocorticoïdes libres.

Par ailleurs, Xu et coll. ont pu montrer que l'action paracrine des glucocorticoïdes peut maintenir le contenu moyen des granules chromaffines en catécholamines ainsi que le nombre de granules sécrétables (Xu *et al.*, 2005). Ainsi, la surexposition des CC aux glucocorticoïdes chez les animaux FR50 pourrait contribuer à augmenter le contenu des granules et/ou la quantité de granules pouvant être libérées, du moins dans les CC A, participant ainsi à l'augmentation des taux de catécholamines au repos chez les animaux dénutris au sevrage. Cependant, en considérant que ni les contenus surrénaliens en catécholamines, ni la densité moyenne des granules chromaffines (résultats non montrés) ne sont modifiés chez les animaux FR50 au sevrage, il

apparaît plus probable que seules les capacités de sécrétion et de synthèse, et non de stockage, soient augmentées chez les animaux FR50.

Parallèlement, il a été proposé que le GAP-43 puisse participer aux processus de transduction et d'exocytose via la régulation du réseau d'actine sous membranaire et du phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate (PIP2) (Frey *et al.*, 2000; Laux *et al.*, 2000). De plus, les animaux GAP-43 *-/-* présentent une réduction de la concentration en NA dans le cerveau antérieur et postérieur, et une augmentation dans le tronc cérébral (Donovan *et al.*, 2002). En considérant que l'expression du GAP-43 est confinée aux CC de phénotype NA dans les deux groupes d'animaux (Molendi-Coste *et al.*, 2006, et figure 22C et D), sa surexpression chez la descendance FR50 au sevrage (Molendi-Coste *et al.*, 2006) pourrait ainsi participer aux altérations, si ce n'est de la machinerie de sécrétion, au moins de l'activité des CC NA.

Enfin, des données récentes indiquent que le mouvement des vésicules à cœur dense est contrôlé par la taille et la dynamique du cytosquelette d'actine F dans les CC bovines (Giner *et al.*, 2007). Nos résultats issus des « macroarrays » montrent que des protéines de liaison au calcium telles que la gelsoline et l'adducine 3, qui participent fortement à la dépolymérisation du réseau d'actine sous-membranaire nécessaire à la fusion des granules à la membrane lors des processus d'exocytose (Citterio *et al.*, 1999; Kaiser *et al.*, 1989; Westberg *et al.*, 1999), sont surexprimées dans les surrénales FR50 au sevrage. Ainsi, les résultats combinés de chromatographie liquide haute performance (HPLC), de microscopie électronique, de biologie moléculaire, et d'activité AChE, suggèrent une hyperactivité « basale » des CC et du système SSR chez les animaux FR50 à la fin de la période de restriction alimentaire. Ceci pourrait représenter, à l'instar de l'hyperactivité de l'axe HHS communément observée dans les modèles de programmation (Vieau *et al.*, 2007)(Lesage *et al.*, 2006; Phillips, 2007), un mécanisme d'adaptation aux conditions environnementales, ici nutritionnelles, précoces défavorables (Young, 2006f).

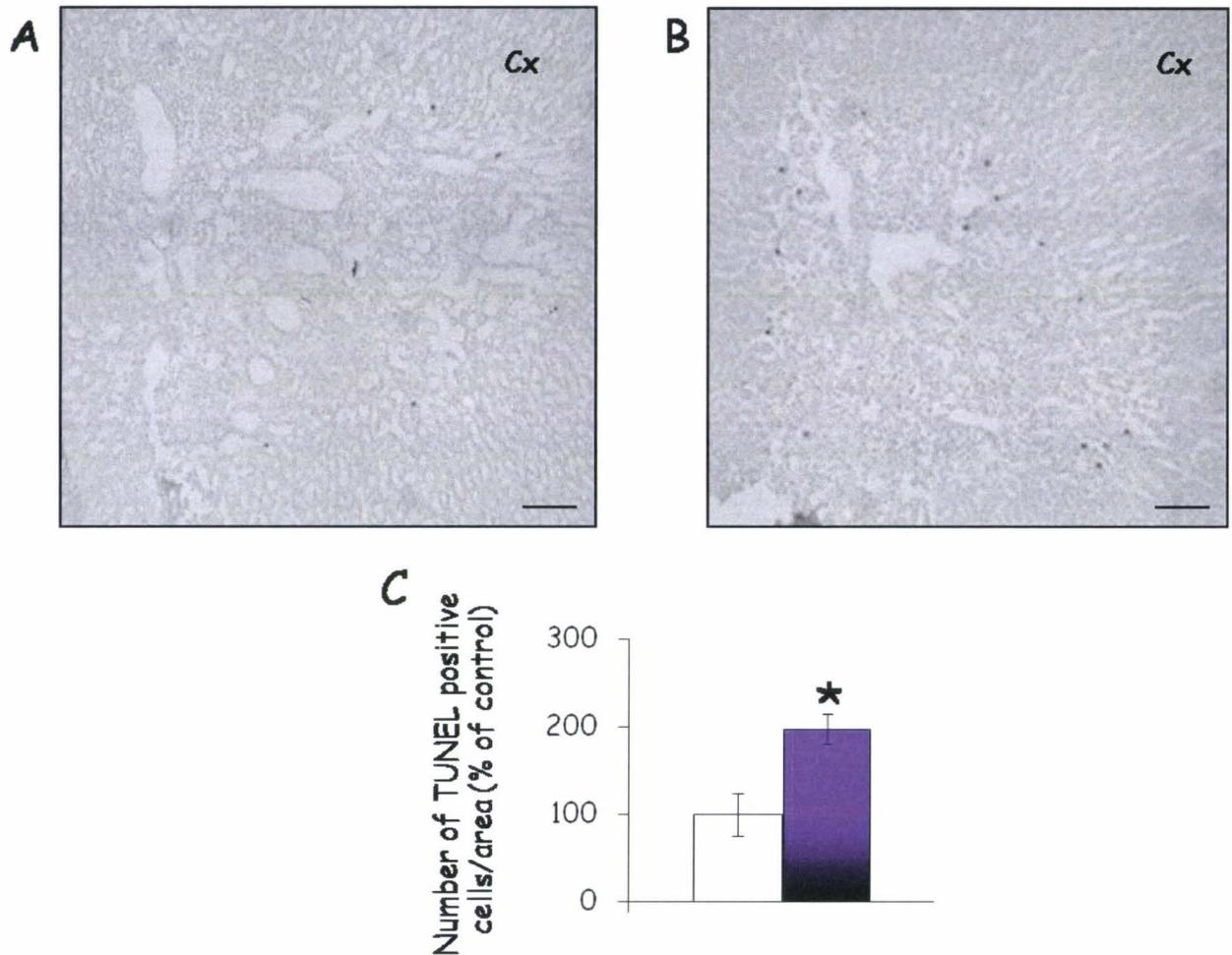


**Figure 22 :** Hybridation *in situ* à l'aide des sondes de la CgB et du GAP-43 dans les surrénales au sevrage. A et B : microphotographies de la sonde CgB dans les glandes surrénales des animaux témoins (A) et FR50 (B). On observe très nettement un marquage diffus dans l'ensemble du tissu chromaffine, et plus dense chez les animaux FR50. C et D : microphotographies de la sonde GAP-43 dans les glandes surrénales des animaux témoins (C) et FR50 (D). La répartition des grains d'argent reflète bien, à l'instar du marquage immunofluorescent, la distribution du GAP-43 dans des îlots de cellules, identifiés ainsi comme NA, plus petits et plus intensément marqués dans les surrénales FR50. Barre d'échelle = 50 µm.

### II.A.2.3. Altérations de la balance prolifération/apoptose

Nos travaux ont également montré que la dénutrition maternelle périnatale de 50% induit de profondes altérations de la prolifération des cellules de la glande médullosurrénale au sevrage (Molendi-Coste *et al.*, *Horm Metab Res.*). En effet, le marquage des noyaux en phase S du cycle cellulaire, à l'aide d'une injection unique de BrDU 24 heures avant le sacrifice (P20), a mis en évidence une réduction homogène du taux de prolifération des différents phénotypes cellulaires (CC A et NA, cellules non chromaffines) de 45 %. Ces altérations avaient tout d'abord été

suspectées suite à l'expression différentielle de plusieurs gènes associés à la prolifération et l'apoptose (Molendi-Coste *et al.*, *Horm Metab Res.*). En particulier, des gènes codant des protéines du cytosquelette impliqués dans les interactions avec la matrice extracellulaire et la régulation de l'homéostasie calcique, telles que l'adducine et la phafine (Silacci *et al.*, 2004; van de *et al.*, 2000; Westberg *et al.*, 1999), ainsi que des protéines de régulation de la synthèse de l'ADN, comme Expi et PLAG2 (Declercq *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2004; Westberg *et al.*, 1999), qui sont impliquées dans les processus d'apoptose, se trouvent être surexprimées dans les glandes surrénales issues d'animaux FR50 (Molendi-Coste *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation de l'activité de la caspase-3, une des enzymes clés de l'apoptose (Fan *et al.*, 2005), évaluée par fluorimétrie (+ 15 %) et immunohistochimie (+ 340 %), suggère une accentuation des phénomènes apoptotiques dans les cellules de la médulla des animaux FR50 au sevrage (Molendi-Coste *et al.* 2007). Afin de quantifier les cellules en apoptose, nous avons choisi de réaliser un marquage des noyaux possédant un ADN fragmenté, ce qui est une des caractéristiques majeures des cellules en phase terminal de l'apoptose (Budihardjo *et al.*, 1999). Nous avons ainsi utilisé la technique du « terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP nick-end-labelling » dite TUNEL à l'aide du kit « ApoptTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit » (Chemicon International). Nous avons pu démontrer qu'il existe un taux très faible d'apoptose, évaluée par la méthode TUNEL, dans les surrénales témoins, comparé au nombre de cellules marquées pour la caspase-3 activée, et que l'apoptose des cellules de la médullosurrénale est augmentée d'un facteur deux ( $100 \pm 33\%$  in control vs.  $198 \pm 34\%$  in FR50,  $p < 0.05$ ; figure 23) chez les animaux FR50. Dans les deux groupes, la majorité des cellules TUNEL positives est localisée à l'interface entre le cortex et la médulla, et seulement de rares cellules apoptotiques ont été observées dans la région centrale de la médulla ainsi que disséminées dans le cortex (figure 23A et B).



**Figure 23** : Apoptose des cellules de la médulla chez le rat mâle au sevrage. A et B : immunomarquages des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL (noyaux noirs) dans les surrénales issues d'animaux témoins (A) et FR50 (B). C : nombre de cellules TUNEL-positives dans la médulla des animaux témoins (colonne vide) et FR50 (colonne pleine). Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. Cx : cortex. \*,  $p < 0,05$  témoins vs. FR50

Cependant, il n'y a pas de corrélation étroite entre les résultats obtenus par la méthode TUNEL et l'immunohistochimie de la caspase-3 activée au sein de chacun des deux groupes d'animaux, et certaines différences subtiles persistent. D'une part, tandis que les cellules TUNEL-positives sont majoritairement localisées à la périphérie de la médulla, les cellules caspase-3 positives sont disséminées au sein de la glande chez les animaux témoins comme chez les animaux FR50. D'autre part, le nombre de cellules caspase-3 positives est largement supérieur à celui des cellules TUNEL positives. Ces observations suggèrent que les deux méthodes détectent des cellules engagées dans des phases différentes d'apoptose. Les cellules proches du cortex subiraient l'action apoptotique des glucocorticoïdes, ce qui aboutirait au final à la fragmentation

de leur ADN nucléaire, et au contraire, les cellules situées dans la médulla, sous l'influence de facteurs anti-apoptotiques sécrétés entre autre par les CC, seraient protégées des effets délétères des glucocorticoïdes. (Frodin and Gammeltoft, 1994; Vaudry *et al.*, 2000a). Par exemple, il a été décrit que le PACAP qui, est produit par les CC NA et les neurones sympathiques préganglionnaires (Vaudry *et al.*, 2000b), peut exercer des effets anti-apoptotiques via l'inhibition de la caspase-3 (Dejda *et al.*, 2005; Vaudry *et al.*, 2000a), notamment dans les cellules PC12 (Onoue *et al.*, 2002a; Onoue *et al.*, 2002b; Vaudry *et al.*, 2000a; Wang *et al.*, 2005) et les neurones sympathiques postganglionnaires (Przywara *et al.*, 1998). Ainsi, sous l'influence de tels facteurs, l'activation de la caspase-3 n'aboutirait pas à une fragmentation de l'ADN dans la majorité des cellules positives chez les deux groupes, et en particulier dans celles situées au centre de la glande, puisque moins soumises à l'influence des glucocorticoïdes. De façon alternative, l'apoptose dans ces cellules « surnuméraires » pourrait être incomplète et/ou aboutir à un clivage de l'ADN en fragments plus longs qui ne sont pas détectés par la méthode TUNEL (Sanders and Wride, 1996).

Une dernière hypothèse serait que l'expression de la forme active de la caspase-3 dans les cellules de la médulla puisse relever de fonctions autres que celles liées à l'apoptose. En effet, de récentes études indiquent que les caspases, et particulièrement la caspase-3, sont impliquées dans la motilité, la prolifération, et la différenciation d'un grand nombre de types cellulaires (Launay *et al.*, 2005), en plus de leurs rôles dans les mécanismes d'apoptose. Ainsi, la localisation et le nombre élevé de cellules caspase-3 positives dans la médullosurrénale des animaux témoins comparativement aux cellules apoptotiques évaluées par la méthode TUNEL, soulèvent effectivement la question d'un nouveau rôle potentiel de la caspase-3 dans le développement des CC, sans rapport avec l'apoptose. De façon très intéressante, il a été démontré que l'activité de la caspase-3 est capable de promouvoir la motilité des cellules PC12 en favorisant le désassemblage du cytosquelette, et contribuerait ainsi à la migration neuronale au cours du développement (Rohn *et al.*, 2004). Ainsi, l'augmentation de l'activité de la caspase-3 observée chez les animaux FR50 pourrait, comme dans le cas des cellules PC12, influencer la ségrégation des CC.

#### *II.A.2.4. Altérations géniques*

Les « macroarrays » que nous avons utilisés dans cette étude comprennent des gènes sensibles au PACAP puisqu'ils ont été sélectionnés en raison de leur surexpression par des cellules PC12 en réponse au PACAP (Grumolato *et al.*, 2003a). Le PACAP est impliqué dans la différenciation, la survie et la sécrétion des CC normales et tumorales (Vaudry *et al.*, 2000b; Yon *et al.*, 1998b). D'une part, le PACAP stimule la prolifération des CC de rat en culture primaire et

inhibe les effets mitogéniques du NGF *in vitro* (Frodin *et al.*, 1995; Tischler *et al.*, 1995). D'autre part, ce peptide provoque un arrêt de la croissance des cellules PC12 tout en induisant une différenciation à la fois neuronale et neuroendocrine (Grumolato *et al.*, 2003b; Onoue *et al.*, 2001).

En considérant que l'expression d'un certain nombre de ces gènes est modifiée par la dénutrition maternelle périnatale, nous avons donc mesuré l'expression du PACAP et de son récepteur, PAC1-R, par RT-PCR en temps réel dans la glande surrénale des animaux témoins et FR50. Comme le montre la figure 24, le niveau d'expression de l'ARNm du PACAP n'est pas modifié, tandis que celui du messager codant pour la sous-unité PAC1-R est accru dans la glande surrénale des animaux FR50 au sevrage, ce qui suggère une augmentation de la signalisation de ce neuropeptide en réponse à la dénutrition périnatale. Le PACAP étant libéré à la fois par les CC NA et par les terminaisons sympathiques (Vaudry *et al.*, 2000b), l'expression de l'ARNm ne concerne que les cellules de la médulla, puisque le corps cellulaire des neurones sympathiques est situé dans la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière thoracique. De plus, le PACAP est sécrété par les fibres cholinergiques et non-cholinergiques qui cheminent dans le nerf splanchnique (Wolf and Krieglstein, 1995; Yon *et al.*, 1998c; Tabarin *et al.*, 1994; Vaudry *et al.*, 2000b). Aussi, l'augmentation de l'innervation cholinergique mise en évidence ci-dessus chez les animaux FR50 (figure 24) pourrait également s'accompagner d'une intensification de la transmission PACAPergique, et ainsi renforcer les effets biologiques du PACAP sur les CC, puisqu'elles expriment d'avantage le récepteur PAC1-R.

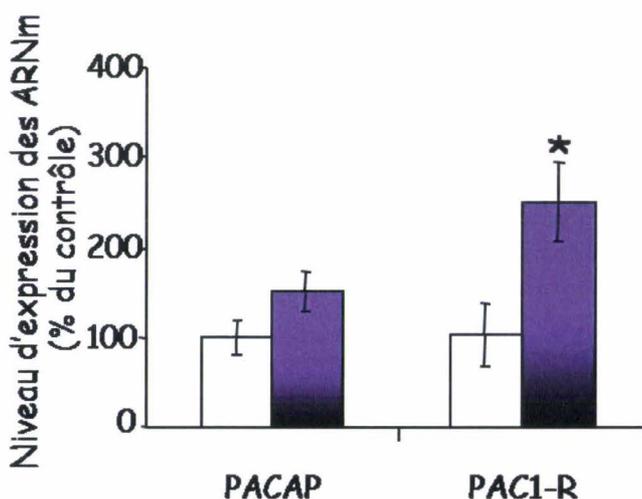


Figure 24 : Expression du PACAP et de son récepteur PAC1-R dans la glande surrénale. Les niveaux d'expression ont été évalués par RT-PCR en temps réel dans les surrénales issues d'animaux témoins (colonne vides) et FR50 (colonnes pleines). Les résultats sont présentés en pourcentage du témoins. \*,  $p < 0,05$  témoins vs. FR50.

#### II.A.2.5. Conclusion

Ainsi, l'ensemble de nos résultats établit que la dénutrition maternelle périnatale altère le développement et la fonctionnalité des cellules chromaffines de la médullosurrénale chez le rat mâle au sevrage (figure 25). Le régime FR50, qui s'applique précisément au cours de la période de différenciation des précurseurs SSR, perturbe donc : 1) la différenciation et la prolifération des CC, et en particulier l'agrégation des CC NA ; 2) la machinerie de sécrétion et l'activité sécrétrice des CC ; 3) l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la différenciation neuroendocrine, la prolifération, et l'apoptose ; 4) le développement de l'innervation sympathique de la médulla. Cependant, un certain nombre de questions restent posées à ce jour :

- Premièrement, nos résultats ne concernant que la mise en place des terminaisons nerveuses préganglionnaires, une étude portant sur le contrôle de l'activité de ces neurones, dont le corps cellulaire est situé dans la région intermédiolatérale de la moelle épinière thoracique, devrait être envisagée.

- Deuxièmement, la présence de l'ARNm de Slit-2, connu comme un facteur chimiotropique de guidance axonale, d'élongation et de branchement (De Castro *et al.*, 2003; Hu, 1999; Ozdinler and Erzurumlu, 2002) et qui n'avait encore jamais été détecté dans la glande surrénale, suggère que ce dernier pourrait être impliqué dans l'établissement de l'organisation des fibres nerveuses intramédullaires, et notamment leur fasciculation. De plus, sachant que Slit-2 est également impliqué dans la migration des cellules de la crête neurale (De Bellard, 2003; Hu, 1999), ce facteur pourrait participer à la ségrégation et/ou l'agrégation des CC. Son augmentation significative chez les animaux FR50 constitue donc peut être un marqueur des altérations architecturales des CC NA et des fibres nerveuses. Bien que nos résultats d'hybridation *in situ* aient montré une expression exclusivement médullaire, une localisation plus fine des types cellulaires qui expriment Slit-2 ou son récepteur pourrait être envisagée afin de mieux appréhender les mécanismes menant à la ségrégation homophénotypique des CC. Nos expériences de marquages radioactifs ayant été infructueuses, cette question restera malheureusement sans réponse.

En conclusion, compte tenu des altérations du développement et de l'activité de l'axe corticotrope précédemment observées chez les animaux FR50 au sevrage (Leonhardt *et al.*, 2002; Lesage *et al.*, 2006; Lesage *et al.*, 2001; Lesage *et al.*, 2002b), nos résultats indiquent que l'activité de la glande surrénale dans son entité double, en tant qu'organe effecteur terminal non seulement de l'axe HHS mais également du système SSR, est un des acteurs impliqués dans la

régulation de l'homéostasie de l'organisme au cours de la dénutrition périnatale en vue d'adapter l'organisme aux conditions nutritionnelles précoces. Ces résultats sont en adéquation avec de récentes études épidémiologiques rapportant une hyperactivité du système SSR chez des enfants ayant présenté un RCIU (Fernald and Grantham-McGregor, 2002; Johansson *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2007; Phillips and Jones, 2006). Ainsi, en plus de reproduire des modifications de l'activité de l'axe corticotrope communément observées en épidémiologie (Vieau *et al.*, 2007; Lesage *et al.*, 2006; Phillips, 2007), le modèle FR50 fournit une base expérimentale à l'étude des altérations de l'activité du système SSR, et de leurs possibles implications dans la programmation. De plus, nos données corroborent un nombre croissant d'études montrant des altérations à la fois fonctionnelles et structurales de l'innervation sympathique (postganglionnaire) de différents organes en réponse à des modifications de l'environnement précoce (Phillips, 2007; Young, 2006; chapitre I.C.3). L'intégralité du système SSR présente ainsi des altérations chez les animaux FR50 au sevrage. Il est possible de suspecter que l'innervation sympathique d'autres organes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique et cardiovasculaire, tels que le pancréas, le rein, ou le cœur, soit modifiée en réponse à la dénutrition périnatale. L'ensemble des adaptations, nerveuses et endocrines, du système SSR à l'environnement nutritionnel précoce défavorable pourrait ainsi potentiellement participer à la genèse des troubles métaboliques et cardiovasculaires programmés par ce même environnement (Phillips, 2007; Young, 2006). Afin d'appréhender cette question, il est nécessaire : d'une part, de déterminer si les altérations observées dans la glande médullosurrénale des animaux FR50 au sevrage correspondent à un retard de maturation globale de la glande, ou bien si elles constituent des adaptations spécifiques de son développement ; d'autre part, de déterminer la persistance et les possibles répercussions de ces altérations de la médullosurrénale chez l'adulte.

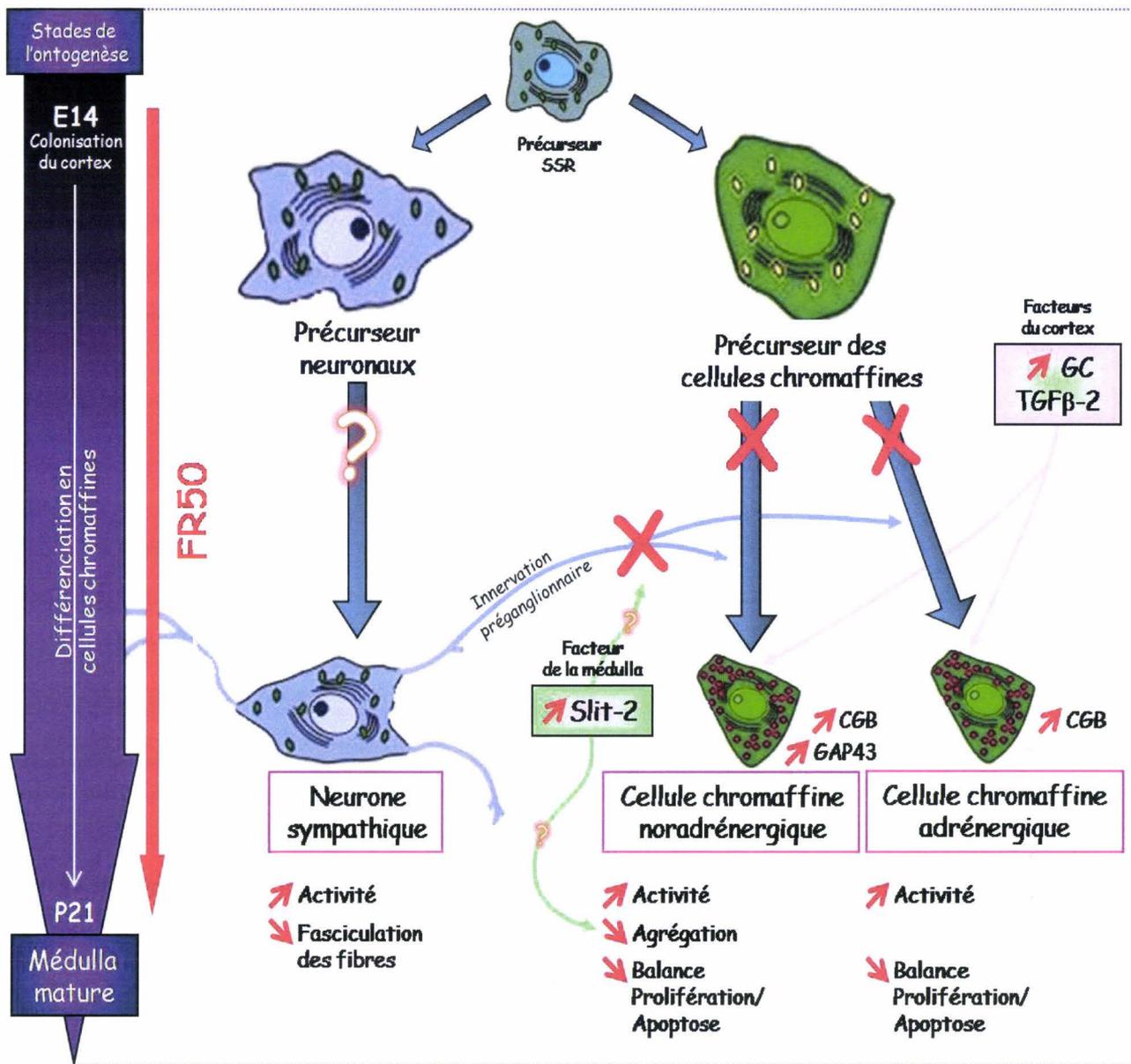


Figure 25: Effets du régime FR50 sur la différenciation des cellules de la lignée SSR

## II.B. Influences de la dénutrition maternelle sur l'ontogenèse de la médullosurrénale au cours de la période postnatale

Afin de définir la période de mise en place des altérations morphologiques et fonctionnelles observées au sevrage, nous avons examiné le développement des CC et évalué la capacité sécrétrice de la médullosurrénale en réponse à un stress métabolique ainsi que son innervation de la naissance au sevrage. Les résultats issus de cette étude font l'objet d'un troisième article (Molendi-Coste *et al.*, 2007, manuscrit soumis à *J Neuroendocrinol.*).

### II.B.1. Résultats : Article 3

#### Résumé :

Des données épidémiologiques et expérimentales indiquent clairement que le développement du système SSR est sensible à l'environnement périnatal. Cependant, l'influence des événements nutritionnels précoces sur le développement de la médullosurrénale et de ses connections fonctionnelles avec le SNS reste à ce jour méconnue. Nous avons précédemment décrit qu'une dénutrition maternelle de 50% (FR50) altère non seulement l'activité des CC et l'organisation des CC NA, mais également la fasciculation des fibres nerveuses intramédullaires chez les animaux au sevrage. Des marquages immunohistochimiques dirigés contre le GAP-43 et la PNMT ont révélé que la réduction de la taille des îlots NA s'établit dès P7, tandis que l'augmentation de leur nombre n'est retrouvée qu'à P14. La mesure des concentrations plasmatiques des catécholamines par HPLC indique, à la naissance, une adaptation spécifique de l'activité de la médullosurrénale chez les animaux FR50. La réponse à un stress métabolique (hypoglycémie induite par l'insuline), qui est utilisée pour déterminer la maturité fonctionnelle de l'innervation, plaide en faveur d'une mise en place précoce et différente de l'innervation chez les animaux dénutris. Ces modifications, qui sont associées à une augmentation de l'activité acétylcholine estérase, aboutissent à une hyperactivité des CC en réponse au stress dès la deuxième semaine de vie postnatale. L'ensemble de ces données indique que les variations structurales et fonctionnelles s'établissent au cours de la deuxième semaine de vie postnatale chez les animaux FR50. Elles ne correspondent donc pas à un retard de maturation de la glande médullosurrénale, mais à une adaptation spécifique en réponse à l'environnement nutritionnel et/ou hormonal délétère engendré par la dénutrition maternelle.

---

# Maternal Perinatal Undernutrition Alters Postnatal Development of Chromaffin Cells in the Male Rat Adrenal Medulla

Olivier Molendi-Coste \*, Christine Laborie \*, Maria Cristina Scarpa, Valérie Montel, Didier Vieau and Christophe Breton<sup>†</sup>

*Unité de Neurosciences et Physiologie Adaptatives UPRES-EA 4052, Equipe dénutritions maternelles périnatales, Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq Cedex, France*

Short title: Adrenal catecholamine and perinatal food restriction

\*These authors equally contributed to this work

<sup>†</sup>Corresponding author : Professor Christophe Breton, Unité de Neurosciences et Physiologie Adaptatives UPRES-EA 4052, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

E-mail : [Christophe.Breton@univ-lille1.fr](mailto:Christophe.Breton@univ-lille1.fr)

Fax: 33 3 20 33 63 49

Tel: 33 3 20 43 65 32

Key words: adrenal chromaffin cells, catecholamine secretion, food restriction, early programming

**Abstract**

Numerous data suggest that development of sympathoadrenal system is highly sensitive to perinatal environment. We previously reported that maternal 50% food restriction (FR50) during the last week of gestation and the lactation altered chromaffin cells (CC) organization and activity in offspring at weaning. This study investigated the effects of FR50 on the postnatal (P) setting time course of CC functional and structural adaptations. FR50 pups exhibited smaller and more abundant scattered clusters noradrenergic CC as soon as P7 indicating that morphological changes took place earlier during development. At birth, the release of adrenaline was defective in FR50 pups suggesting that maternal FR50 impaired the non-neurogenic control of the catecholamine release. At P4, we showed that the catecholamine release in response to insulin-induced hypoglycaemia was also absent in FR50 pups. This was associated with the reduction of catecholamine adrenal contents, indicating that the failure to synthesise catecholamine might lead to impaired secretion. We hypothesise that maternal FR50 accelerates the functional connections between the CC and splanchnic nerve endings leading to the premature loss of the non neurogenic response. Acetylcholine containing synaptic endings seems more precociously functional in FR50 pups as suggested by increased level of acetylcholine esterase activity at P14. At P7, we observed that insulin-induced hypoglycaemia causes preferential adrenaline release associated with increased catecholamine contents in both groups. However, the response was accentuated in FR50 pups. At P14, the insulin challenge increased adrenaline plasma level in control rats whereas it markedly enhanced circulating level of both catecholamine in FR50 pups. We demonstrated that maternal FR50 leads to developmental impaired noradrenergic CC aggregation, advanced splanchnic neurotransmission maturation associated with altered medulla activity in response to metabolic stress. This might participate to the long-lasting malprogramming of adrenal medulla and contribute to the development of chronic adult diseases.

## **Introduction**

Human epidemiological data and experimental studies have shown that impaired intrauterine growth is associated with an increased incidence of cardiovascular, metabolic and cognitive diseases in later life (1-3). These observations have led to the concept of “fetal programming” or Barker hypothesis (4) which implies that adverse intrauterine environmental factors, particularly undernutrition, might elicit genetic, morphologic and functional adaptations leading to long-term dysfunctions and diseases (5).

Development of the mammalian nervous system and neuroendocrine axes begins during fetal life and continues after birth. Indeed, several intrauterine and postnatal events might affect the maturation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathoadrenal (SA) system (6-9). On the one hand, it is well documented that prenatal glucocorticoid overexposure such as maternal stress or dexamethasone injection produces alterations of the rat fetal HPA. This could also program long-lasting HPA functions leading to persisting changes in the stress response and chronic diseases in adulthood (10-13). On the other hand, several studies suggested that the nutritional status of mothers and offspring in rats led to impaired anatomical and functional development of the SA system (9,14-17). In humans, preterm birth as well as fetal growth restriction are associated with modified SA activity, not only in childhood (18,19), but also in adulthood (20). In addition, adverse environmental factors during development permanently alter both the sympathetic innervation of peripheral tissues and the responsiveness of the adrenal medulla to various stimuli (21).

Adrenal medullary chromaffin cells (CC) are derived from SA pluripotent stem cells originating from the neural crest, which acquire SA characteristics, such as tyrosine hydroxylase expression and the consequent noradrenergic phenotype, during their migration. Subsequently, SA progenitors differentiate into sympathetic neurons and small intensely

fluorescent (SIF) cells in the ganglia or continue their migration to the adrenal gland. Finally, these chromoblasts colonise the cortical primordium around E15 and differentiate into neuroendocrine CC or medullary neurones (22). The expression of phenylethanolamine-N-methyl transferase (PNMT) and the associated adrenergic phenotype are dependent upon the stimulation by glucocorticoids which occurs mainly at the vicinity of glucocorticoid-containing cells in the adrenal cortex (23,24). Some neuronal markers such as growth-associated protein 43 (GAP43) that are present in chromoblasts and in intra-medullary sympathetic neurones are repressed in differentiated adrenergic CC after birth, notably by glucocorticoids, and persist only in differentiated noradrenergic CC (25). Functional connections between splanchnic nerve endings and adrenal CC are absent or incomplete at birth. Splanchnic neurotransmission becomes effective at the end of the first postnatal week (26). Numerous data suggest that the final structural and biochemical maturation of adrenal medulla results from complex interactions between several growth factors produced by CC, neuronal inputs and neurotransmission through the splanchnic nerve (25,27,28).

We have shown previously that maternal 50 % food restriction during the last week of gestation and lactation (FR50) decreases adrenal size and alters activity of the HPA axis in offspring (6,29). It also markedly impairs the neuronal and neuroendocrine differentiation of the adrenal medulla in male at weaning. In particular, we demonstrated that noradrenergic CC aggregation as well as nerve fibres fasciculation was altered in the medulla from FR50 pups (30). In addition, we reported that maternal undernutrition induces over-expression of several genes involved in neuroendocrine differentiation, synaptic plasticity and axonal fasciculation (30). These morphological and transcriptional changes were associated with enhanced circulating levels of catecholamine. These data suggested that maternal FR50 might delay and/or cause a fundamental reprogramming of structural and functional maturation of the adrenomedullary cells. To

distinguish between these alternatives, we compared, from E21 to P14, the CC adrenomedullary organization, the time course of catecholamine adrenal contents and plasma levels and the functional innervation, i.e. discharge of catecholamine by neurogenic stimuli in control *versus* FR50 rats.

Our results demonstrated that maternal FR50 leads to developmental impaired noradrenergic CC aggregation as soon as P7, advanced splanchnic neurotransmission maturation associated with altered medulla activity in response to metabolic stress. These alterations might have long-lasting consequences and participate, via malprogramming of adrenal medulla, to the pathogenesis of chronic adult diseases.

---

## Materials and Methods

### *Animals and Regimen*

Female (250-300g) Wistar rats (Charles Rivers Laboratories, L'Arbresle, France) were maintained under controlled light cycle (12 h light from 07.00 am to 7.00 pm) and temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and had free access to tap water and food (regular rat chow No. 113, containing 22% protein, 5% fat, 53% carbohydrates; UAR, Villemoisson-sur-Orge, France). After acclimation, females were mated with a male for 1 night and day 0 of pregnancy (E0) was defined if spermatozoa were found in the vaginal smears. Pregnant females ( $n = 30$ ) were assigned randomly to either control or FR50 group. Maternal food restriction (50 % of *ad libitum* intake) was established from embryonic day 14 (E14) until weaning (postnatal day 21, P21) (29), while control animals had free access to chow. Dams were delivered either by caesarean for the E21 stage, or spontaneously during the night between E21 and P1 for all other stages studied (P4, P7, and P14), and pups were weighed the day of sacrifice. At birth, litter size was adjusted to 8 pups /litter in both groups in order to normalize the availability of maternal milk to the progeny. Experiments were conducted only on male pups.

Animal use accreditation by the French Ministry of Agriculture (No. 04860) has been granted to our laboratory for experimentation with rats. All animal experiments were conducted in accordance with the European Communication Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

### *Plasma and Tissue Collections*

At the time of sacrifice, pups were killed by decapitation by skilled staff with well-maintained equipment between 8.00 and 11.00 am. Trunk blood samples were immediately collected in tubes pre-rinsed with 5% EDTA and centrifuged. Plasma samples were stored at –

80°C until determination of circulating noradrenaline and adrenaline. Right adrenals were frozen in liquid N<sub>2</sub> for catecholamine assessment. Left adrenals were post fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PBS) and cryoprotected by incubation for 24 h in PBS 0.05M containing 20% sucrose for immunohistochemistry. The adrenals were cut into serial 12- $\mu$ m sections, mounted on gelatine-coated slides and directly stored at -80°C for immunohistochemistry analysis.

### *Immunohistochemistry*

In order to follow the differentiation and aggregation of CC, immunostaining of differentiated adrenergic CC was performed with a polyclonal rabbit anti-PNMT antibody (Chemicon International, Temecula, CA), whereas immunostaining of noradrenergic CC was realized using a monoclonal mouse anti-GAP43 antibody (Sigma, St. Louis, MO).

Adrenal sections were incubated with anti-PNMT (1:1000 dilution) and anti-GAP43 antibodies (1:500 dilution) overnight at room temperature. Sections were incubated with a mixture of FITC-conjugated goat anti-rabbit and TRITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibodies (1:300 dilution) (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) for 2 h at room temperature. Sections were then rinsed in PBS and mounted with Fluorescent Mounting Medium (Dako). Four adrenals from each experimental group were analyzed, and two adjacent sections from the median region of the medulla were examined for each adrenal gland with a Zeiss Axioplan Microscope II (Zeiss Light Microscopy, Gottingen, Germany) coupled to the Multi-Analyst software. The area, number, and total area of noradrenergic clusters as well as the total area of adrenergic cells were normalized to the total area of the medulla investigated. This term is defined as relative value.

*Adrenomedullary response to metabolic stress*

To test the neurotransmission in the adrenomedullary axis, reflex splanchnic stimulation was elicited by insulin-induced hypoglycaemia. These experiments were conducted using a single insulin injection (15 IU/kg, ip) on postnatal rats (P4, P7 and P14), which were killed by decapitation before injection (T0), and 30 min (T30) and 180 min (T180) after insulin injection. Blood glucose was immediately measured with a glucometer (Glucotrend 2, Roche Diagnostics, France). Plasma samples and adrenals were frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80°C until catecholamine assays. Results are presented as percentages of values obtained at T0 in each group.

*High Performance Liquid Chromatography*

Adrenals were sonicated in 1 mL of ice-cold 0.2 M HClO<sub>4</sub> and centrifuged at 20,000 x g at 4°C for 20 min. The supernatants were used to determine noradrenaline and adrenaline contents by HPLC coupled with electrochemical detection as previously described (31). Catecholamine assays in plasma samples were also performed by HPLC after alumina extraction as previously described (31).

*Acetylcholine esterase histochemistry*

Acetylcholine esterase (AChE) histochemistry was performed accordingly to the direct colouring thiocholine method (32). Adrenals were rapidly frozen in liquid N<sub>2</sub>, mounted on a tissue holder with embedding medium (Tissue-Tek, Miles Inc.), and cut into serial 14µm thick sections. Sections were mounted on glass slides coated with poly-L-lysine (Sigma, Saint-Louis, MO, USA). Adrenal sections were fixed in acetone for 15 min and then air dried at room temperature for 30 min. Slices were incubated for 45 min at 37°C in a 50 mM acetate buffer (pH 5) containing 2 mM acetylthiocholine iodide, 2 mM copper sulphate, 10 mM glycine, and 20 µM

tetraisopropylpyrophosphoramidate (iso-OMPA, Sigma), which inhibits non-specific AChE activity. Sections were rinsed five times in 50 mM acetate buffer (pH 5), incubated in a 1.25 % sodium sulphide solution, and then transferred in a 1 % silver nitrate solution. Negative control sections, which were incubated (1) after omission of acetylthiocholine substrate, and (2) in the presence of  $10^{-4}$  M eserine (Sigma), did not show any reaction under these conditions. In order to assure for the occurrence of the reaction, positive control slides were incubated in the absence of iso-OMPA. Four adrenal sections from the median region of the medulla were analyzed for each adrenal gland (n=3) with a Bio-Rad GS-700 imaging densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Optical density (OD) values were used to express the intensity of AChE activity staining, and were normalized to the total area of the medulla examined.

#### *Statistical Analysis*

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the unpaired Student's *t*-test and the SigmaStat software.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

---

**Results***Effects of maternal food restriction on adrenal medulla development*

As previously reported, body and absolute adrenal weight were significantly reduced at birth and during the postnatal life in FR50 pups (6,29). We used an immunohistochemical approach to compare the sequence of events in the appearance of noradrenergic and adrenergic CC in the adrenal medulla. On E21, the earliest stage examined in the study, GAP43 immunoreactivity was mainly apparent in large chromoblasts in both control (Fig 1A) and FR50 (Fig 1B) adrenal medulla. Few differentiated adrenergic cells expressing PNMT were already present at this stage of development, surrounding the chromoblasts or disseminated in small clusters in the presumptive medulla structure. The relative total area of chromoblasts was not significantly different between the two groups (Fig 2A). In addition, the relative total area of PNMT positive cells was comparable in FR50 and control rats (Fig 2A).

At P4, occasional chromoblasts showing strong GAP43 immunoreactivity were still observed. At this stage, CC are aggregated in the medullar region, and the majority is labelled with PNMT (Fig 1C and 1D). PNMT positive cells represent about 50 % of the medulla, compared to 18 % at E21 in both groups. A great proportion of PNMT positive cells co-express GAP43 whereas some clusters of CC are stained with PNMT or GAP43 alone. A reliable evaluation of total GAP43 immunoreactivity could not be achieved as GAP43 staining was too largely diffuse within the medulla. By contrast, PNMT labelling showed that the relative total area of PNMT positive cells was similar in both groups (Fig 2B). No significant differences were observed in the structural organization of the adrenal medulla between control and FR50 rats.

At P7, the adrenal medulla was completely compacted and formed exclusively by homophenotypic clusters of either noradrenergic or adrenergic cells, which respectively represent about 10 % and 51 % of the total medulla area. Indeed, double-immunolabeling revealed that

GAP43 was only expressed in noradrenergic cells but was undetectable in PNMT- expressing adrenergic cells in both control and FR50 animals (Fig 1E and 1F). Some residual heterophenotypic clusters constituted by GAP43 and PNMT immunoreactive cells were still observable. In control rats, noradrenergic CC formed few clusters of small size preferentially localized at the periphery, whereas adrenergic CC were not aggregated uniformly within the medulla (Fig 1E). In FR50 adrenal glands, noradrenergic clusters were scattered throughout the medulla (Fig 1F), and their relative area was reduced by 50 % compared to controls, whereas their relative number was not different (Fig 2C). While there was a trend toward lower relative total area of noradrenergic clusters, this did not reach statistical significance. The relative total area of adrenergic clusters in the medulla was similar in control and FR50 animals (Fig 2C).

At P14, CC were distinctly aggregated to form noradrenergic and adrenergic homophenotypic clusters in both groups (Fig 1G and 1H). The spatial organization resembled that described at P7. At this stage, the relative area of noradrenergic clusters was reduced by 60 % in FR50 adrenals, whereas their relative number was increased by more than 200 %, when compared to controls (Fig 2D). However, the relative total area of noradrenergic and adrenergic cells in the medulla were similar between control and FR50 glands (Fig 2D). In control rats, the relative area of noradrenergic clusters increases between P7 and P14, whereas their relative number decreases during this period. Thus, during normal adrenal growth, throughout the second postnatal week, the size of noradrenergic clusters increases whereas the number remains constant (Table 1). In contrast, in FR50 rats, the relative area of noradrenergic clusters fails to increase between P7 and P14 whereas their relative number increases, indicating thus that the size of noradrenergic clusters remains stable while the number increases (Table 1).

---

In control and FR50 rats, adrenal catecholamine contents increased between E21 and P14 (Fig 3A). Prenatal food restriction significantly increased the noradrenaline (70 %) and adrenaline (48 %) contents at P4. At P7, both noradrenaline and adrenaline concentrations decreased slightly above control values and, then returned to control levels at P14 (Fig 3A). However, the adrenaline/noradrenaline ratio increase from E21 until P14 was similar in both groups. In control rats, plasma catecholamine levels were high at birth, declined rapidly at P4, and then increased until P14 (Fig 3B). In FR50 rats, ontogenesis of the plasma noradrenaline levels was similar to that observed in controls. By contrast, adrenaline plasma levels were dramatically reduced at birth (-280 %), and then increased progressively until P14, reaching values approaching those of control pups as soon as P4 (Fig 3B). Thus, undernourished rats exhibited a lower adrenaline/noradrenaline ratio (-250 %) in plasma at E21 compared to control rats.

#### *Response to metabolic stress*

Adrenomedullary response to metabolic stress was evaluated by treatment with insulin, which induces hypoglycaemia and triggers splanchnic nerve stimulation. Glycaemia as well as catecholamine plasma and adrenal concentrations were measured in non-fasted pups (P4, P7, and P14) before, 30 min and 180 min after insulin injection. As indicated in Table 2, plasma glucose values increased progressively during postnatal life in both groups. However, in basal conditions, glycaemia was significantly lower in pups from FR50 dams. At P4, time course of glycaemia variation after insulin administration was similar in both groups. However, at P7 and P14, hypoglycaemia was more accentuated in FR50 compared to control pups.

Differences in the adrenomedullary response to insulin-induced hypoglycaemia were observable between control and FR50 rats (Fig 4 and Fig 5). At P4, adrenaline and noradrenaline plasma levels were increased in response to insulin challenge in control pups (Fig 4A), whereas

this did not occur in FR50 animals (Fig 4B). At P7, adrenaline plasma levels was augmented in both groups (T30 and T180), whereas noradrenaline plasma levels was unchanged (Fig 4A and 4B). However, the adrenaline plasma values at T30 and T180 were higher in FR50 rats compared to controls values. At P14, the increase in adrenaline plasma levels was still observed in both groups, and was still enhanced at T30 in FR50 pups (Fig 4A and 4B). Noradrenaline plasma levels were not modified after insulin administration in controls rats (Fig 4A), whereas plasma noradrenaline levels were significantly increased in FR50 animals (Fig 4B).

At P4, adrenaline and noradrenaline adrenal contents were not modified after insulin in control rats (Fig 5A), whereas they were significantly reduced in FR50 adrenals (Fig 5B). At P7, noradrenaline adrenal contents increase in response to insulin challenge in both control (Fig 5A) and FR50 rats (Fig 5B), whereas adrenaline adrenal contents showed a transient increase (at T30) in FR50 rats (Fig 5B). However, noradrenaline and adrenaline adrenal contents were higher in FR50 rats compared to control ones. At P14, noradrenaline adrenal contents were maintained in both control and FR50 rats whereas adrenaline concentration was significantly reduced 180 min after injection in both groups (Fig 5A and 5B).

#### *Effects of maternal food restriction on acetylcholinesterase activity*

Table 3 summarizes the temporal development of AChE activity in the postnatal adrenal medulla of control and FR50 rats. At birth, AChE activity was very weak and comparable in both groups with diffuse staining observed in chromoblasts and in few nerve fibres within the medulla. From E21 to P7, AChE activity progressively increased in control rats while the AChE activity increased more rapidly in FR50 rats, particularly between E21 and P4. From P7 to P14, the level of AChE activity staining remained stable in control rats whereas it continued to increase in FR50 animals. In addition, at P14, the AChE activity was significantly increased in FR50 rats *versus*

control rats. At this stage, AChE activity was clearly associated with fibres bundles and delicate strands of axons making dense contacts with clusters of CC.

**Discussion**

We previously showed that maternal FR50 leads to adrenal atrophy, impairs activity of the offspring HPA axis (6,29) and alters the differentiation of the adrenomedullary cells as well as the fasciculation of nerve fibres at weaning (30). These data suggested that maternal FR50 might retard or alternatively induce a specific reorganization of structural and functional maturation of the adrenomedullary cells. To try to discriminate between these possibilities, we compared the effects of FR50 on the structural and functional development of adrenomedullary cells in male rat from birth until two weeks of age.

At birth, GAP43 staining was observed in few large clusters of chromoblasts, whereas PNMT immunoreactivity was present in rare cells surrounding the chromoblasts or forming isolated small clusters. At this stage, no difference was observed in both size and number of chromoblasts between control and FR50 rats. Thus, maternal food restriction that was initiated at E14 did not disturb the migration of CC progenitors inside the adrenal cortex. The architecture of the adrenal medulla implying the differentiation and the segregation of CC into homophenotypic groups takes place during the first two postnatal weeks. We observed that the adrenal medulla was completely individualized and formed exclusively by clusters of either adrenergic (81%) or noradrenergic (20%) cells, both in control and FR50 rats. However, we demonstrated that maternal FR50 impaired the aggregation of noradrenergic CC in the second postnatal week. As soon as P7, the size of noradrenergic clusters increased in the medulla of control pups, whereas it remained constant in FR50. By contrast, the number of noradrenergic clusters increased in the adrenal medulla of FR50 pups whereas it remained stable in controls. As previously described at P21 (30), the structural organization led to the formation of smaller, more abundant and more scattered clusters in the adrenal medulla of FR50 pups. These data indicated that morphological changes were precociously observed and presumably related to irremediable and not delayed

maturation of noradrenergic CC. Segregation of CC was reported to mainly depend on the differential expression of adhesion molecules between noradrenergic and adrenergic CC such as L1 and neural cell adhesion molecule (NCAM) (25) whose expression and/or activity might be modified by maternal FR50. Accordingly, we reported, at P21 in the adrenal medulla of FR50 pups, the overexpression of several genes known to be involved in the neural plasticity and cell migration as GAP43, NeuF3 and Slit2 that might constitute an adaptative mechanism to CC impaired aggregation (30). As reported for weaning animals, the morphology of adrenergic clusters was unaffected by maternal perinatal food restriction. This suggests that distinct subsets of chromoblasts might give rise to the two principal types of CC (25,27) or that the less differentiated noradrenergic phenotype might be more sensitive to perinatal nutritional environment than fully differentiated adrenergic cells.

The process of CC segregation within the adrenal medulla was tightly associated to the differential innervation between homophenotypic noradrenergic and adrenergic clusters, thus promoting the differential adrenaline secretion response to neural stimuli (33-35). We hypothesised that maternal FR50 might also modify both the development and the distribution of nerve endings within the CC. Thus, we decided to evaluate the functionality of the splanchnic innervation within the adrenal medulla by means of adrenomedullary response to insulin-induced hypoglycaemia as well as AChE activity. On the one hand, insulin-induced hypoglycaemia is a stimulus that triggers the activation of splanchnic nerve terminals and causes preferential release of adrenaline from the adrenal medulla (36,37). On the other hand, during the postnatal development, the AChE activity was preferentially observed in nerve fibres in contact with CC clusters in the rat adrenal medulla (34,38).

At birth, we showed that the release of adrenaline was defective in FR50 pups, suggesting that FR50 newborns were likely less sensitive to stress associated with birth. In addition, it

suggests that maternal FR50 impaired the non-neurogenic control of the catecholamine release because at this stage, splanchnic control of adrenal medulla is not yet effective (39-42). It is in accordance with the observation that intrauterine growth retardation led to the complete loss of the adrenaline synthesis and release in response to hypoxia (43,44). At P4, we showed that the catecholamine release in response to insulin-induced hypoglycaemia was absent in FR50 rats whereas control pups exhibited no preference in adrenaline and noradrenaline secretion in accordance with a non-neurogenic activation. Insulin might mediate this effect since it has been shown that insulin receptors are present on CC and that insulin induces synthesis and release of catecholamine *in vitro* (27,45,46). The impaired catecholamine release in FR50 rats was associated with the significant reduction of the catecholamine adrenal contents, indicating that the failure to synthesise catecholamine was correlated with impaired secretion. These data suggest that maternal FR50 might accelerate the development of functional neuronal connections within the adrenal medulla, and could be responsible for the premature loss of the non-neurogenic response. This notion is also supported by the fact that, from birth to P4, acetylcholine containing synaptic endings were already present in the nerve fibres as suggested by the rapid increase of AChE activity in FR50 adrenal medulla compared to controls.

At P7, the majority of synaptic endings has mature appearance and marks the onset of a functional innervation of CC that links preganglionic impulse flow to exocytosis of catecholamine (26). At this stage, we observed that reflex neuronal stimulation evoked by insulin-induced hypoglycaemia triggered preferential secretion of adrenaline associated with increase in catecholamine adrenal contents in both control and FR50 pups. However, the response was significantly accentuated in FR50 rats. At P14, the insulin challenge increased adrenaline plasma levels in control rats, whereas it enhanced circulating levels of both adrenaline and noradrenaline in FR50 rats. Since the source of circulating noradrenaline in response to hypoglycaemia is

expected to derive largely from the adrenal medulla (47), the secretion of noradrenaline is likely due to a mechanism of specific physiological adaptation to neonatal adverse nutritional environment. Taken together, the fact that the aggregation of noradrenergic cells was profoundly altered in the adrenal medulla of FR50 between P7 and P14 and that the AChE activity was highly increase in these animals at P14 strengthens the idea that maternal FR50 might modify the nature and/or the degree of preganglionic cholinergic innervation of adrenomedullary cells. Accordingly, we observed in FR50 adrenal pups a pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) signalling increase (data not shown) that might, at least in part, contribute to the secretion of noradrenaline during periods of prolonged hypoglycaemia. Indeed, PACAP is preferentially observed in cholinergic nerve terminals innervating noradrenergic cells in the adrenal medulla (48). A study using the mice deficient for PACAP demonstrated that PACAP is needed to maintain catecholamine biosynthesis and secretion during metabolic stress (49).

In conclusion, we demonstrated for the first time, that maternal FR50 interferes with the aggregation of noradrenergic cells as well as the preganglionic sympathetic innervation and participates in the malprogramming of hypoglycaemia responsiveness. Although underlying mechanisms involved in these alterations are unclear, we speculate that hormonal and/or nutritional status induced by the maternal food restriction might highly account for these structural and functional alterations. It remains to establish whether these effects might evoke long-lasting changes in the adult adrenal medulla structure and functionality and, thus, might contribute to the pathogenesis of chronic adulthood diseases.

**Abbreviations**

AChE, acetylcholine esterase; CC, chromaffin cells; FR50, food restriction 50%; GAP43, growth-associated protein 43; HPA axis, hypothalamo-pituitary-adrenal axis; NCAM, neuronal cell adhesion molecule; NeuF3, neurofilament 3; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PNMT, phenylethanolamine-N-methyl transferase; SA, sympathoadrenal; SIF, small intensely fluorescent

**Acknowledgement**

The authors wish to thank A. Dickes-Coopman for technical assistance. This study was supported by the Conseil Régional du Nord-Pas-de-Calais.

## References

1. Langley-Evans SC. Developmental programming of health and disease. *Proc. Nutri. Soc.* 2006; **65**: 97-105.
2. Barker DJ. The origins of developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 2007; **261**: 412-7.
3. Vuguin PM. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm. Research* 2007; **68**: 113-123.
4. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, and Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993; **36**: 62-67.
5. Gluckman PD and Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research direction. *J. Intern. Med.* 2007; **261**: 461-71.
6. Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, and Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 2001; **142**: 1692-1702.
7. Seckl JR and Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Ann NY Acad Sci* 2004; **1032**: 63-84.
8. Eleftheriades M, Creatsas G, and Nicolaidis K. Fetal growth restriction and postnatal development. *Ann NY Acad Sci* 2006; **1092**: 319-30.
9. Young JB. Programming of sympathoadrenal function. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002; **13**: 381-5.
10. Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur. J. Endocrinol.* 2004; **151** **Suppl 3**: U49-U62.
11. Lesage J, Sebaai N, Léonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, and Vieau D. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress.* 2006; **9**: 183-198.
12. Vieau D, Sebaai N, Léonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Molendi-Coste O, Laborie C, Breton C, Deloof S, and Lesage J. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. *Psychoneuroendo.* 2007; **Aug: 32** **Suppl 1**: S16-S20.

13. Phillips DI. Programming of the stress response: a fundamental mechanism underlying the long-term effects of the fetal environment? *J. Intern. Med.* 2007; **261**: 453-460.
14. Santer RM and Conboy VB. Prenatal undernutrition permanently decreases enteric neuron number and sympathetic innervation of Auerbach's plexus in the rat. *J. Anat.* 1990; **168**: 57-62.
15. Young JB and Morrison SF. Effects of fetal and neonatal environment on sympathetic nervous system development. *Diabetes Care* 1998; **21 Suppl 2**: B156-B160.
16. Petry CJ, Dorling MW, Wang CL, Pawlak DB, and Ozanne SE. Catecholamine levels and receptor expression in low protein rat offspring. *Diabet. Med.* 2000; **17**: 848-853.
17. Phillips DI and Jones A. Fetal programming of autonomic and HPA function: do people who were small babies have enhanced stress response. *J. Physiol.* 2006; **572**: 45-50.
18. Fernald LC and Grantham-McGregor SM. Growth retardation is associated with changes in the stress response system and behavior in school-aged jamaican children. *J. Nutr.* 2002; **132**: 3674-3679.
19. Johansson S, Norman M, Legnevall L, Dalmaz Y, Lagercrantz H, and Vanpee M. Increased catecholamines and heart rate in children with low birth weight: perinatal contributions to sympathoadrenal overactivity. *J. Intern. Med.* 2007; **261**: 480-487.
20. Boguszewski MC, Johannsson G, Fortes LC, and Sverrisdottir YB. Low birth size and final height predict high sympathetic nerve activity in adulthood. *J. Hypertens.* 2004; **22**: 1157-1163.
21. Young JB. Developmental origins of obesity: a sympathoadrenal perspective. *Int. J. Obes. (Lond)* 2006; **30 Suppl 4**: S41-S49.
22. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification and new perspectives. *Dev. Biol.* 2006; **298**: 335-43.
23. Finotto S, Krieglstein K, Schober A, Deimling F, Lindner K, Bruhl B, Beier K, Metz J, Garcia-Ararras JE, Roig-Lopez JL et al. Analysis of mice carrying targeted mutations of the glucocorticoid receptor gene argues against an essential role of glucocorticoid signalling for generating adrenal chromaffin cells. *Development* 1999; **126**: 2935-2944.
24. Kennedy B and Ziegler MG. Ontogeny of epinephrine metabolic pathways in the rat: role of glucocorticoids. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2000; **18**: 53-59.
25. Langley K and Grant NJ. Molecular markers of sympathoadrenal cells. *Cell Tissue Res.* 1999; **298**: 185-206.

26. Tomlinson A and Coupland RE. The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *J. Anat.* 1990; **169**: 209-236.
27. Schober A, Krieglstein K, and Unsicker K. Molecular cues for the development of adrenal chromaffin cells and their preganglionic innervation. *Eur. J. Clin. Invest* 2000; **30 Suppl 3**: 87-90.
28. Schober A and Unsicker K. Growth and neurotrophic factors regulating development and maintenance of sympathetic preganglionic neurons. *Int. Rev. Cytol.* 2001; **205**: 37-76.
29. Léonhardt M, Lesage J, Dufourny L, Dickes-Coopman A, Montel V, and Dupouy JP. Perinatal maternal food restriction induces alterations in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and in plasma corticosterone-binding globulin capacity of weaning rat pups. *Neuroendocrinology* 2002; **75**: 45-54.
30. Molendi-Coste O, Grumolato L, Laborie C, Lesage J, Maubert E, Ghzili H, Vaudry H, Anouar Y, Breton C, and Vieau D. Maternal perinatal undernutrition alters neuronal and neuroendocrine differentiation in the rat adrenal medulla at weaning. *Endocrinology* 2006; **147**: 3050-3059.
31. Bernet F, Dedieu JF, Laborie C, Montel V, and Dupouy JP. Circulating neuropeptide Y (NPY) and catecholamines in rat under resting and stress conditions. Arguments for extra-adrenal origin of NPY, adrenal and extra-adrenal sources of catecholamines. *Neurosci. Lett.* 1998; **250**: 45-48.
32. Karnovski MJ and Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* 1964; **12**: 219-221.
33. Holgert H, Dagerlind A, and Hokfelt T. Immunohistochemical characterization of peptidergic innervation of the rat adrenal gland. *Horm.metab.Res.*1998; **30**: 315-322.
34. Iwasa K, Oomori Y, and Tanaka H. Acetylcholinesterase activity, and neurofilament protein, and catecholamine synthesizing enzymes immunoreactivities in the mouse adrenal gland during postnatal development. *J. Vet. Med. Sci.* 1999; **61**: 621-629.
35. Morrisson SF and Cao WH. Different adrenal sympathetic preganglionic neurons regulate epinephrine and norepinephrine secretion. *Am. J. Physiol. Regul. Integrative Comp. Physiol.* 2000; **279**: R1763-R1775.

36. Pacak K, and Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 2001; **22**: 502-548.
37. Vollmer RR, Balcita-Pedicino JJ, Debnam AJ, and Edwards DJ. Adrenal medullary catecholamine secretion patterns in rats evoked by reflex and direct neural stimulation. *Clin. Exp. Hypertens.* 2000; **22**: 705-715.
38. Holgert H, Dagerlind A, Hokfelt T, and Lagercrantz H. Neuronal markers, peptides and enzymes in nerves and chromaffin cells in the rat adrenal medulla during postnatal development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1994; **83**: 35-52.
39. Seidler FJ and Slotkin TA. Ontogeny of adrenomedullary responses to hypoxia and hypoglycemia: role of splanchnic innervation. *Brain Res. Bull.* 1986; **16**: 11-14.
40. Thompson RJ, Jackson A, and Nurse CA. Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells. *J. Physiol* 1997; **498 ( Pt 2)**: 503-510.
41. Munoz-Cabello AM, Toledo-Aral JJ, Lopez-Barneo J, and Echevarria M. Rat adrenal chromaffin cells are neonatal CO<sub>2</sub> sensors. *J. Neurosci.* 2005; **25**: 6631-6640.
42. Rico AJ, Prieto-Lloret J, Gonzalez C, and Rigual R. Hypoxia and acidosis increase the secretion of catecholamines in the neonatal rat adrenal medulla: an in vitro study. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 2005; **289**: C1417-C1425.
43. Shaul PW, Cha CJ, and Oh W. Neonatal sympathoadrenal response to acute hypoxia: impairment after experimental intrauterine growth retardation. *Pediatr. Res.* 1989; **25**: 466-472.
44. Kauffman KS, Seidler JF, and Slotkin TA. Prenatal dexamethasone exposure cause loss of neonatal hypoxia tolerance: cellular mechanisms. *Pediatr. Res.* 1994; **35**: 515-522.
45. Yamamoto R, Yanagita T, Kobayashi H, Yuhi T, Yokoo H, and Wada A. Up-regulation of functional voltage dependent sodium channel by insulin in cultured bovine adrenal cells. *J. Neurochem.* 1996; **64**: 1401-1408.
46. Yamamoto R, Kobayashi H, Yanagita T, Yokoo H, Kurose T, and Schiraishi S *et al.* Up-regulation of cell surface insulin receptor by protein kinase C- $\alpha$  in adrenal chromaffin cell: involvement of transcriptional and translational events. *J. Neurochem.* 2000; **75**: 672-682.
47. Segel SA, Paramore DS, and Cryer PE. Hypoglycemia-associated autonomic failure in advanced type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; **51**: 724-733

48. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, and Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 2000; **52**: 269-324.

49. Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, and Eiden LE. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2002; **99**: 461-466.

## Figure legends

**Figure 1:** GAP43 and PNMT immunohistochemistry in control (A, C, E, G) and FR50 (B, D, F, H) adrenal glands from birth until the end of the second postnatal week. Double immunofluorescence was performed for GAP43 (red) and PNMT (green) in the adrenal medulla at E21 (A, B), P4 (C, D), P7 (E, F) and P14 (G, H). At E21, strong GAP43 immunoreactivity was observed in chromoblasts (A, B, asterisk). The presumptive adrenal medulla was surrounded by dotted lines. At P4, PNMT positive cells were detected in clusters staining with GAP43 (arrow) and some clusters were stained with GAP43 (asterisk) or PNMT (arrowhead). At P7 and P14, noradrenergic and adrenergic clusters were completely individualized. E and G show the typical organization of adrenal medulla from control rats, with large clusters of noradrenergic CC (asterisk). F and H show morphological alterations of adrenal medulla from FR50 rats, with more numerous and smaller noradrenergic clusters (asterisk). *Data represent means  $\pm$  SEM (n=5 animals per group). Magnification bars, 100  $\mu$ m (A and B) and 50  $\mu$ m (C-F).*

**Figure 2:** GAP43 and PNMT immunostaining in FR50 adrenals from birth until the end of the second postnatal week. Relative area and relative number of GAP43 immunoreactivity (left panel) and proportion of GAP43 and PNMT positive cells (right panel) in the medulla at E21 (A), P4 (B), P7 (C) and P14 (D). Bar graphs: white (control), grey (FR50). The data are expressed as percentages of control values. *Data represent means  $\pm$  SEM (n=5 animals per group). \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ , FR50 vs. control.*

**Figure 3:** Time course of catecholamine adrenal content (A) and plasma levels (B) in control (dotted lines) and FR50 (solid lines) rats. Noradrenaline was represented with triangle markers and adrenaline with round markers. *Data represent means  $\pm$  SEM (n=5-10 animals per group). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  FR50 vs. control.*

**Figure 4:** Evolution of catecholamine plasma levels in response to a single insulin injection at P4, P7 and P14 in control (A) and FR50 rats (B). Evaluation was realised at T0, T30 and T180 and results are presented as percentages of variation to group-matched T0 values. Bar graphs: white (noradrenaline), grey (adrenaline). *Data represent means +/- SEM (n=5-10 animals per group). \*, P < 0.05 ; \*\*, P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001 T30 and T180 vs T0.*

**Figure 5:** Evolution of catecholamine adrenal contents in response to a single insulin injection at P4, P7 and P14 in control (A) and FR50 rats (B). Evaluation was realised at T0, T30 and T180 and results are presented as percentages of variation to group-matched T0 values. Bar graphs: white (noradrenaline), grey (adrenaline). *Data represent means +/- SEM (n=5-10 animals per group). \*, P < 0.05 ; \*\*, P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001 T30 and T180 vs T0.*

**Table 1:** Noradrenergic clusters organization in the adrenal medulla from P7 and P14 animals. GAP43 immunostaining experiments were used for determination of noradrelanine clusters area and number (presented as absolute and relative values). All values are given in arbitrary units. *Data represent mean  $\pm$  SEM. \*\*,  $p < 0,01$  P7 vs.P14.*

	Control				FR50			
	Area	Relative area	Number	Relative number	Area	Relative area	Number	Relative number
P7	33.8 $\pm$ 5.3	1,1 $\pm$ 0.1	9,9 $\pm$ 1.6	3,3 $\pm$ 0.8	21,4 $\pm$ 5.3	0,6 $\pm$ 0.1	13,5 $\pm$ 1.1	3,6 $\pm$ 0.6
P14	59.7 $\pm$ 3.2**	1,3 $\pm$ 0.1	9,7 $\pm$ 1.7	2,1 $\pm$ 0.1	22,1 $\pm$ 2.1	0,5 $\pm$ 0.1	18 $\pm$ 1.8**	4,5 $\pm$ 0.4

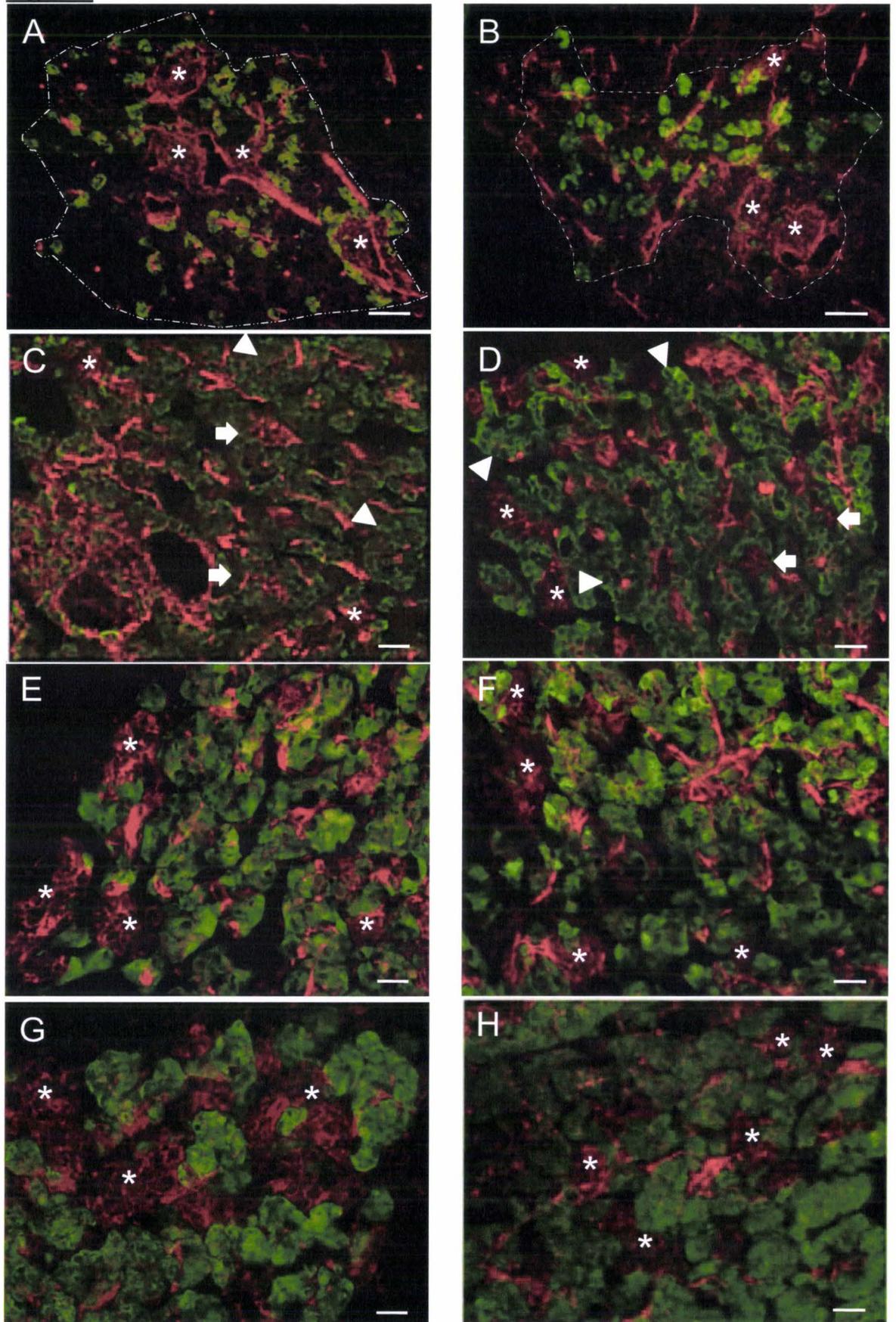
**Table 2:** Plasma glucose before and after insulin administration (15 IU/kg, ip) in 4, 7 and 14 day-old rats. All values are given in g/dl. *Data represent mean ± SEM. \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001 FR50 vs. control by one- way Anova with Scheffer's post-hoc test.*

	Control			FR50		
	Basal	Insulin		Basal	Insulin	
		T30	T180		T30	T180
P4	92,3 ± 2.1	34,9 ± 5.7	21 ± 2.8	74,6 ± 2.4***	34,2 ± 4.6	17 ± 2.5
P7	103,4 ± 1.7	30,5 ± 2.1	17,4 ± 1.8	91,1 ± 1.6***	40,3 ± 2.7*	12 ± 0.8**
P14	115,4 ± 2.3	40,3 ± 2.4	17 ± 1.6	100,2 ± 2.7***	28,1 ± 1.4***	10,4 ± 0.3**

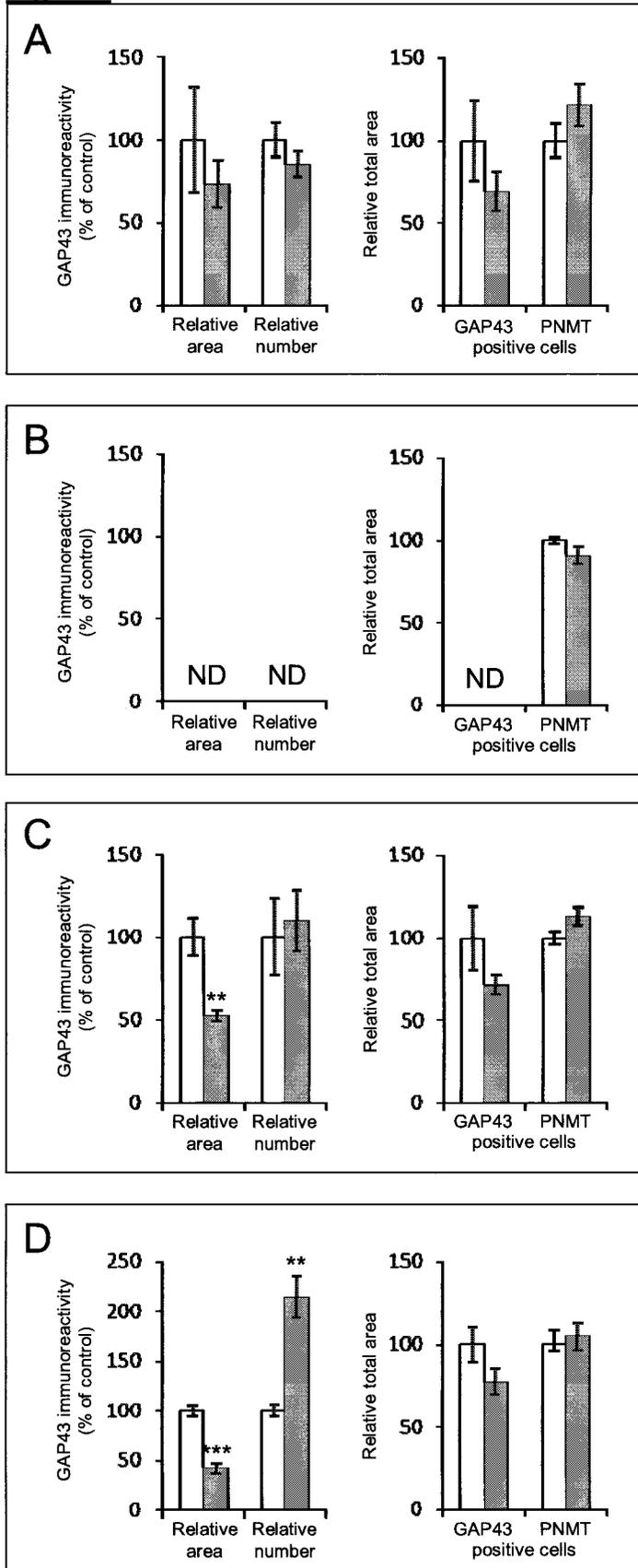
**Table 3:** Temporal evolution of acetylcholine esterase activity in adrenal medulla from control and FR50 rats. All values are given in arbitrary units. *Data represent means +/- SEM (n=5 animals per group). \*, P < 0.05 FR50 vs. control.*

	Control	FR50
E21	2.46 ± 0.44	1.68 ± 0.04
P4	3.56 ± 1.83	6.75 ± 2.13
P7	5.79 ± 0.91	6.24 ± 1.01
P14	4.92 ± 0.95	9.48 ± 0.70*

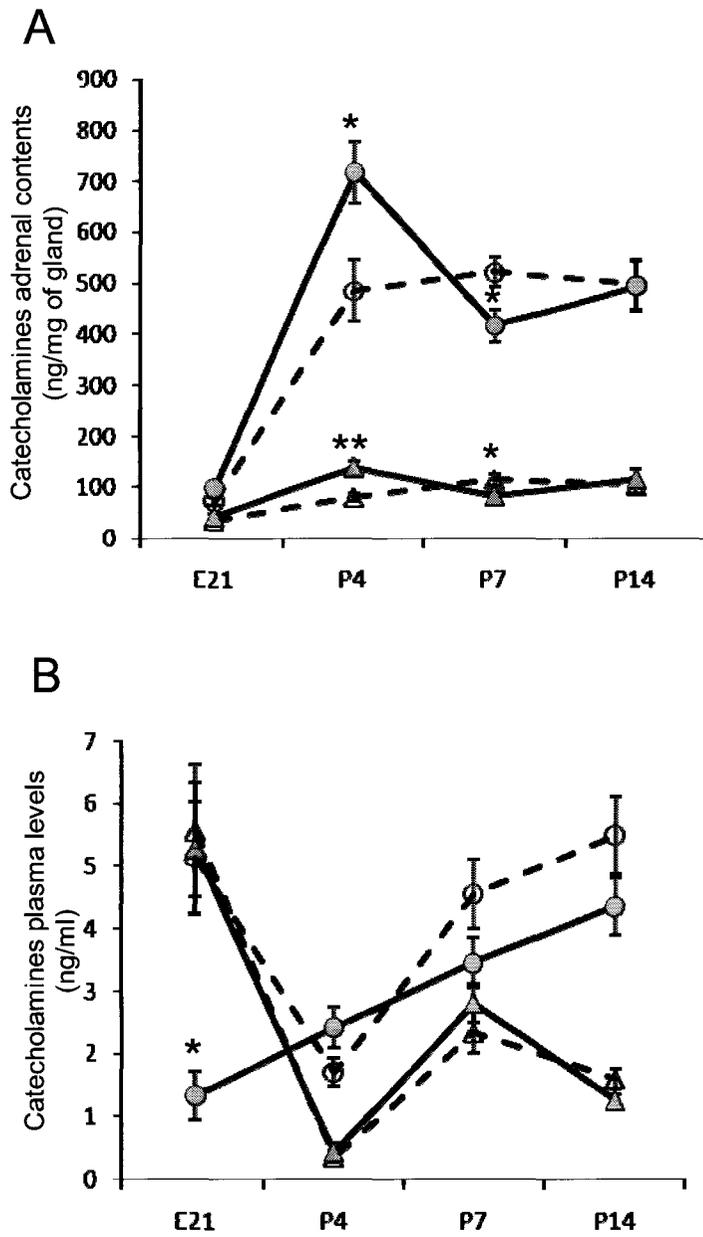
Figure 1



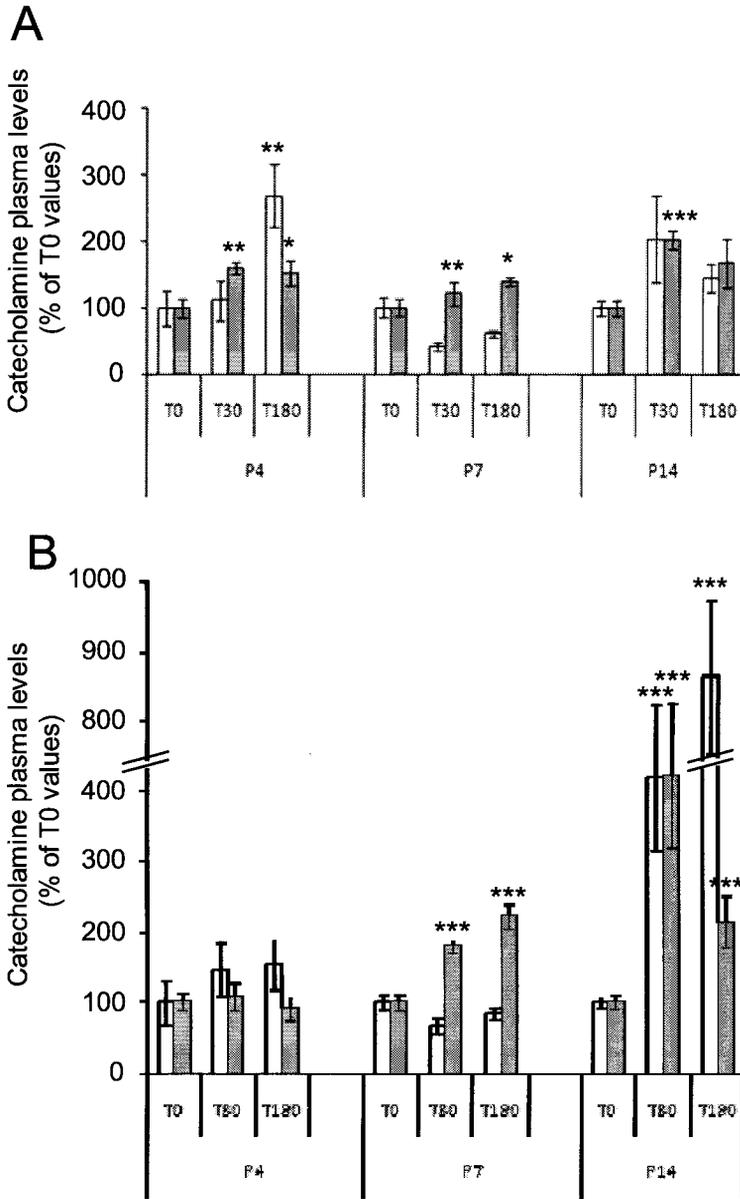
**Figure 2**



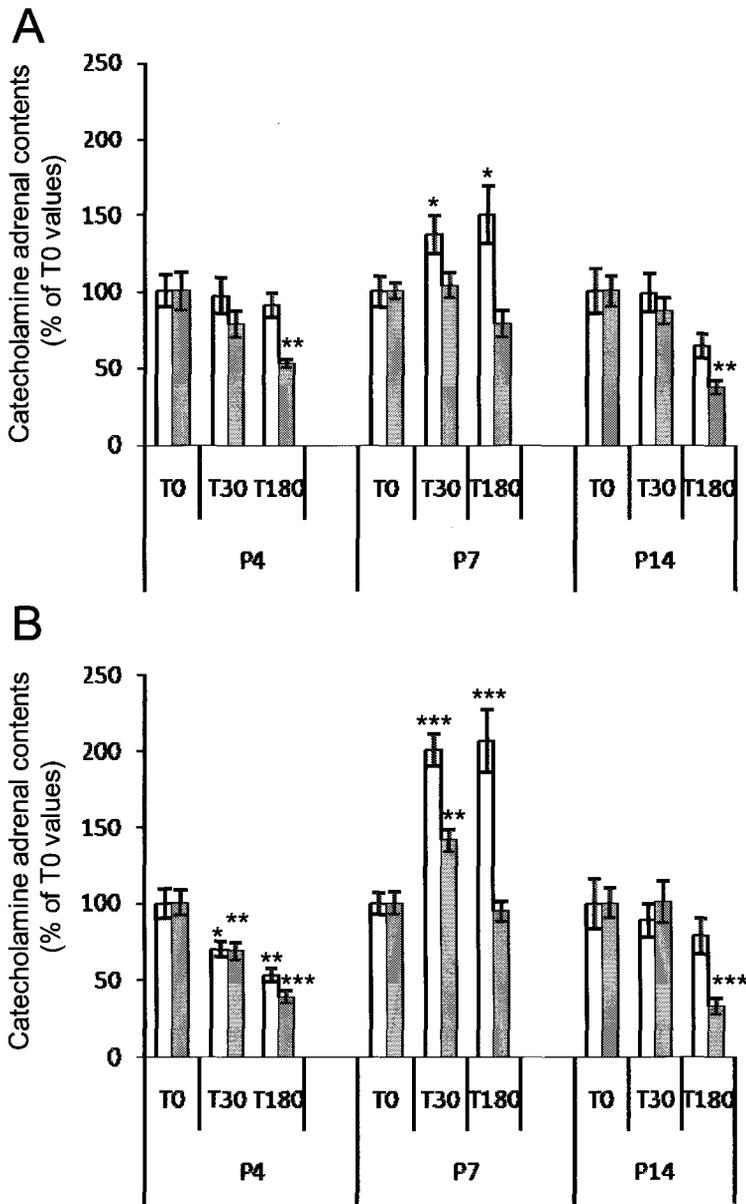
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



particulièrement la forte diminution du pic de leptine, puisse participer à la genèse des altérations retrouvées dans la médulla des animaux FR50, et qui se mettent en place majoritairement au moment où a normalement lieu le pic de leptine (2<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale). Enfin, il est intéressant de noter que les glucocorticoïdes semblent nécessaires à l'élévation de leptine, produite majoritairement par le tissu adipeux périrénal, en fin de gestation chez le mouton, celle-ci étant absente après une surrénalectomie et pouvant être provoquée prématurément chez le fœtus sain par injection de glucocorticoïdes (O'Connor *et al.*, 2007).

Les animaux FR50 présentent une réduction concomitante de l'insulinémie au cours de cette période (de P7 à P14, données non publiées). Il est alors possible que la réduction des taux basaux d'insuline puisse également prendre part aux modifications de la mise en place, si ce n'est morphologique, fonctionnelle des surrénales FR50.

Les modifications de la réponse de la glande surrénale au stress à l'insuline sont manifestement liées à un accroissement de l'activité sympathique préganglionnaire. Bien que l'ACh soit le principal neurotransmetteur impliqué dans la stimulation nerveuse des CC (Douglas and Rubin, 1961a; Douglas and Rubin, 1961b), le fait que des agonistes cholinergiques ne reproduisent ni la sécrétion prolongée des catécholamines, ni l'activation de la biosynthèse de ces dernières observées lors d'une stimulation du nerf splanchnique laissait présumer l'influence d'autres molécules co-sécrétées par les terminaisons préganglionnaires (Malhotra *et al.*, 1988; Malhotra and Wakade, 1987a; Malhotra and Wakade, 1987b; Wakade *et al.*, 1988). Par la suite, un certain nombre d'études réalisées *in vivo* et *in vitro* a permis de montrer que le PACAP agit tel un neurotransmetteur dans les synapses établies entre les terminaisons sympathiques et les CC (Holgert *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 1992). De façon surprenante, les souris portant une invalidation génique du gène du PACAP ne présentent aucune altération de la morphologie, de l'innervation, ainsi que du contenu en catécholamines de la glande médullosurrénale (Hamelink *et al.*, 2002), ce qui va plutôt à l'encontre de cette idée. De plus, chez ces animaux, la glycémie ne semble également pas être affectée par la délétion, de même que la sécrétion précoce des catécholamines en réponse à une hypoglycémie induite par l'insuline. Cependant, l'hypoglycémie est plus sévère et prolongée chez les animaux KO. En considérant que les auteurs décrivent une réponse « normale » de l'axe HHS au stress à l'insuline, parallèlement à une réduction de la réponse plasmatique de l'A, cette incapacité des souris PACAP<sup>-/-</sup> de contre réguler de façon adéquate le niveau de glucose plasmatique pourrait s'expliquer par l'insuffisance de la sécrétion d'A. Cette insuffisance découlerait vraisemblablement de l'absence de l'induction

de la TH, normalement retrouvée dans ces conditions chez les animaux sauvages, qui conduit à une déplétion des stocks surrenaliens en A. Ainsi, le PACAP semble nécessaire pour coupler la synthèse d'A à la sécrétion durant un stress métabolique, agissant donc ainsi comme un co-transmetteur du système SSR impliqué dans la « réponse d'urgence » de régulation de l'hypoglycémie induite par l'insuline (Vaudry and Taupenot, 2002). Cette réponse serait contrôlée principalement par l'ACh, mais secondairement par ce neuropeptide, dans des conditions para-physiologiques impliquant une réponse soutenue et l'induction de la TH surrenalienne. Dès lors, la capacité accrue de réponse des CC à l'insuline observée chez les animaux FR50 à P7 et P14, pourrait être liée, compte tenu de l'intensification concomitante de l'innervation sympathique, à une intensification de la signalisation du PACAP dans la médullosurrénale. Bien que nous n'ayons pas évalué l'intégrité de l'innervation préganglionnaire PACAPergique, et que le messenger du PACAP ne subisse pas de modification dans la surrenale des animaux FR50 au sevrage, la surexpression de la sous-unité PAC1-R du récepteur au PACAP à ce stade (Molendi-Coste *et al.*, 2006) laisse présumer une augmentation de la sensibilité des CC à ce neuropeptide.

#### *II.B.2.3. Conclusion*

En conclusion, l'étude portant sur l'ontogénèse a permis de mieux appréhender la séquence d'apparition des altérations qui touchent les CC et leur innervation chez les animaux FR50 (figure 27). Cette séquence d'évènement témoigne de modifications spécifiques de la mise en place des cellules de la médullosurrénale et de son innervation en réponse à la dénutrition périnatale, qui se font précocement au cours de la période postnatale, et va à l'encontre d'un retard de différenciation et de développement de la glande. La dernière semaine de gestation et la lactation constituent donc une période critique de l'ontogénèse du système SSR qui, si elle se trouve perturbée par un environnement nutritionnel défavorable, conduit à des altérations de la formation des îlots de CC et du développement de leur innervation, ainsi qu'à des modifications de leur réactivité. Ces résultats sont en accord avec les études rapportant une certaine plasticité du système SSR au cours de l'ontogénèse (Young, 2006), et traduisent des adaptations structurales et fonctionnelles spécifiques de la médullosurrénale à l'environnement nutritionnel défavorable, qui pourraient persister chez adulte et participer ainsi à l'apparition de troubles métaboliques et cardiovasculaires.

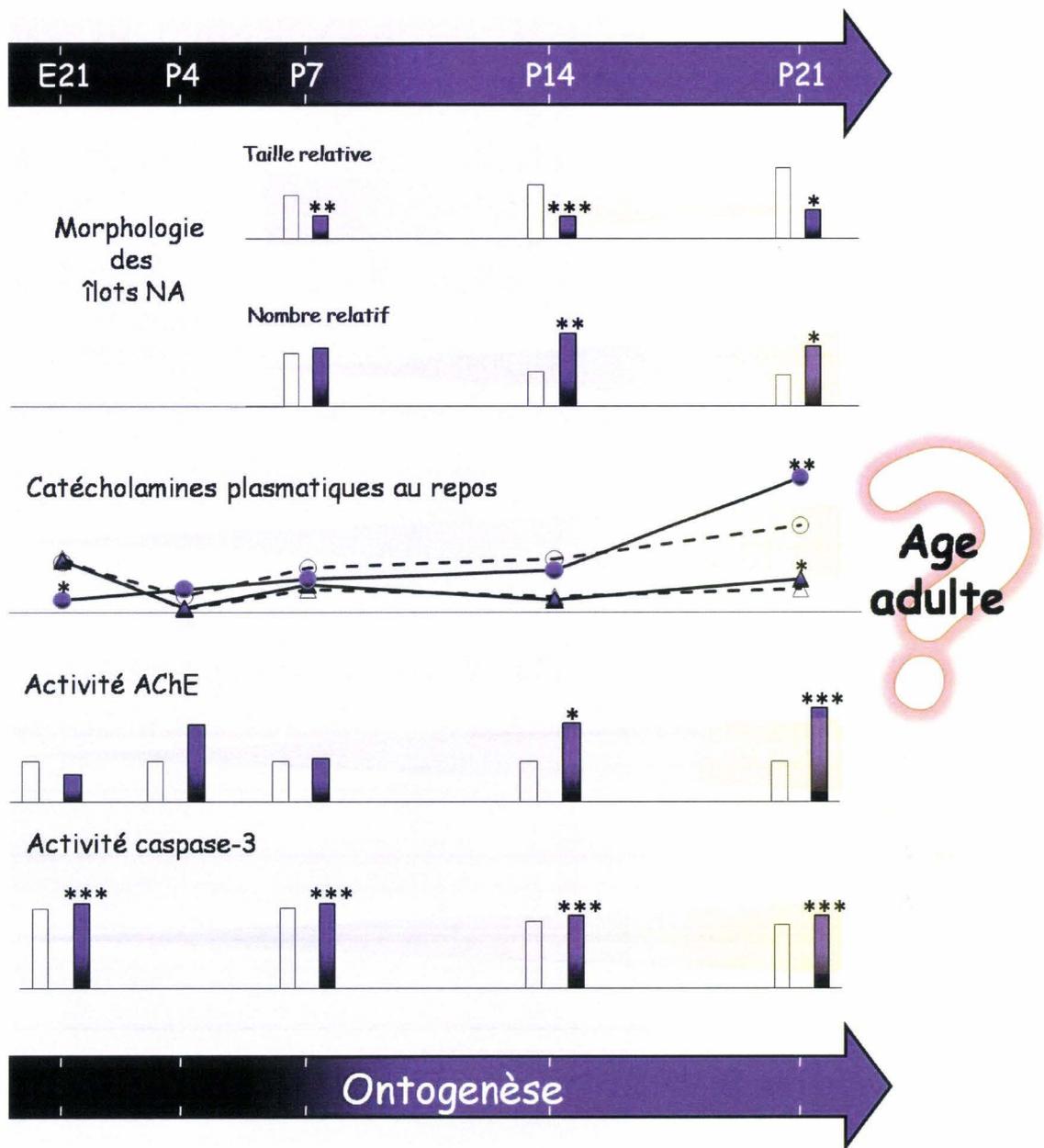


Figure 27 : Ontogenèse des altérations de la médullosurrénale au cours de la lactation. La morphologie (taille et nombre relatifs) des îlots NA, le taux plasmatique de NA (triangles) et d'A (ronds) au repos, l'activité AChE, et l'activité caspase-3 sont présentés pour les animaux témoins (colonnes vides et lignes pointillées) et FR50 (colonnes et lignes pleines). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0,01$  témoins vs. FR50.

**III EFFETS DE LA DENUTRITION MATERNELLE PERINATALE SUR LA MORPHOLOGIE, L'ACTIVITE ET L'EXPRESSION GENIQUE DE LA GLANDE MEDULLOSURRENALE CHEZ LE RAT MALE ADULTE**

### III.A. Introduction

Le syndrome métabolique, défini comme l'association symptomatologique de troubles homéostatiques, parmi lesquels se trouvent l'obésité, le diabète de type II (regroupant intolérance au glucose et résistance à l'insuline), l'hypertension artérielle ainsi que l'hypercholestérolémie et l'hypertriglycéridémie, constitue aujourd'hui un des problèmes majeurs de santé mondiale (Bjorntorp, 1992). Selon la théorie de la programmation précoce des maladies de l'adulte, un environnement défavorable, tel qu'une sous-nutrition, au cours de périodes critiques de l'ontogenèse entraînerait des modifications anatomiques, fonctionnelles et métaboliques du fœtus qui conduiraient à l'augmentation de la prévalence de pathologies métaboliques et cardiovasculaires à long terme (Barker *et al.*, 1993b). Ces modifications, visant à préparer le fœtus aux futures conditions extra-utérines délétères, mèneraient à une « mésadaptation » de certains organes et axes neuroendocriniens une fois l'organisme confronté à un environnement plus favorable (Barker, 1998).

Le SSR, qui est constitué du SNS et de la glande médullosurrénale, joue un rôle central dans la régulation du métabolisme cardiovasculaire et énergétique ainsi que dans la réponse au stress. Bien que les effets d'un environnement précoce défavorable soient d'une grande hétérogénéité, des modifications du système SSR sont fréquemment retrouvées chez les mammifères présentant un retard de croissance précoce. Chez l'homme, un faible poids de naissance est associé à une augmentation de la fréquence cardiaque et de la sécrétion des catécholamines pendant l'enfance, ainsi qu'à une augmentation de l'activité sympathique à l'âge adulte (Johansson *et al.*, 2007; Phillips, 2007; Young 2006). Chez l'animal, une dénutrition périnatale aboutit globalement à une diminution de l'innervation sympathique de certains tissus et à une augmentation de l'activité de la glande médullosurrénale au cours des différentes périodes de la vie (Young, 2002). Cette association récurrente ainsi que diverses données sur l'influence pathogène des catécholamines suggèrent que des adaptations du système SSR à des stimulations précoces pourraient s'avérer délétères une fois l'organisme vieillissant, et contribuer ainsi à l'augmentation de la prévalence de l'obésité, de l'hypertension, et du diabète de type 2, programmés par l'environnement précoce (Young, 2002; Young, 2006; Young and Morrison, 1998). L'occurrence et la place de ces mécanismes dans les altérations découlant d'une dénutrition périnatale restent cependant très mal connues.

Nous avons précédemment démontré qu'une dénutrition maternelle de 50 %, pratiquée de la dernière semaine de gestation au sevrage, entraîne un retard de croissance précoce ainsi que de profondes modifications de la différenciation des cellules chromaffines et de la mise en place structurale et fonctionnelle de la médullosurrénale au cours du développement postnatal. Ces altérations sont associées à une hyperactivité de la glande chez le rat mâle au sevrage (Molendi-Coste *et al.*, 2006 ; Molendi-Coste *et al.*, soumis à J Neuroendocrinol.). Afin de définir l'impact à long terme de ces adaptations précoces à la restriction nutritionnelle, nous avons étudié l'organisation et l'activité de la médullosurrénale et de son innervation, ainsi que l'expression génique de la glande surrénale chez des rats FR50 âgés de 8 mois. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que la dénutrition maternelle périnatale programme des modifications de la physiologie et de l'innervation de la glande médullosurrénale et altère la réponse des CC au jeûne chez l'adulte. En considérant l'influence majeure de la médullosurrénale et des catécholamines dans le maintien de l'homéostasie, ces adaptations du système SSR pourraient participer à la genèse des troubles métaboliques et cardiovasculaires programmés par le régime FR50.

### III.B. Matériels et Méthodes

#### III.B.1. Groupes expérimentaux et prélèvements

Dans notre modèle de dénutrition maternelle périnatale (FR50), les rates gestantes (n = 10) Wistar (250-300 g) subissent une restriction alimentaire de 50% durant la dernière semaine de gestation et toute la durée de la lactation. Les rates gestantes contrôles (n = 10) sont nourries *ad libitum* pendant la même période. A la naissance, les portées sont normalisées à 8 nouveaux nés. Les animaux sont séparés de la mère au sevrage (P21) et maintenus en cage collective (n = 5/cage) jusqu'à la puberté (P40). Seuls les mâles sont alors conservés pour l'étude et placés en cage individuelle jusqu'à l'âge de 8 mois. La masse corporelle des animaux contrôles et FR50 est mesurée tous les mois.

Pour le dosage des catécholamines urinaires, les rats contrôles et FR50 (n = 6) sont placés en cage métabolique à 7 mois et demi pour une période d'acclimatation de deux semaines. Les urines sont alors prélevées toutes les 24 heures en conditions basales durant trois jours, puis en réponse à un jeûne de trois jours (72 heures). Le pH urinaire est ajusté à 2 à l'aide d'un volume adéquat d'acide chlorhydrique 2N, et les urines sont ensuite stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

A 8 mois, les animaux (n = 16) sont sacrifiés par décapitation entre 9 et 11 heures, le sang troncal est immédiatement collecté dans des tubes pré-rincés à l'EDTA, et la glycémie est évaluée sur une goutte de sang à l'aide d'un glucomètre. Les glandes surrénales, qui sont destinées aux expériences de macroarray, d'HPLC, et d'évaluation de l'activité AChE, sont ensuite disséquées dans les plus brefs délais, pesées, congelées dans de l'azote liquide, et stockées à -80°C. Le plasma est récupéré après centrifugation 20 minutes à 14000 g à 4°C, congelé dans de l'azote liquide, et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

#### III.B.2. Immunohistochimie

Cette technique a pour but d'analyser l'architecture de la médullosurrénale et de caractériser les phénotypes chromaffines qui la composent. Pour ce faire, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre le GAP-43 (marqueur des neurones et des CC NA) et la PNMT (marqueur des CC A).

Les animaux (n = 5) sont anesthésiés au pentobarbital et perfusés avec 50 mL de NaCl à 9 g/L suivis de 150 mL de PBS 0,1 M contenant 2 % de para-formaldéhyde (PFA). Les surrénales sont post-fixées par immersion dans la même solution de PFA à 4°C pendant 24 heures. Après fixation, les tissus sont rincés dans 3 bains successifs de tampon phosphate salin (PBS) (0,05 M pH 7,4) contenant 20% de saccharose (cryoprotecteur) pendant 24 h à 4°C. Les surrénales sont incluses dans du Tissue-Tek et les blocs sont conservés à -80°C. Des coupes de 12 µm sont ensuite réalisées, montées sur lames gélatinées, et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Les lames sont ramenées à température ambiante et rincées 10 minutes dans trois bains de PBS (0,1 M pH 7,4). Les anticorps primaires dilués dans du PBS (0,1 M pH 7,4) contenant 0,25 % de Triton sont déposés sur les lames (400 µL). Les anticorps utilisés sont les suivants : anticorps anti-GAP-43 dilué au 1/500<sup>ème</sup> (monoclonal de souris, Sigma) et anticorps anti-PNMT dilué au 1/1000<sup>ème</sup> (polyclonal de lapin, Chemicon International, CA, USA). L'incubation est réalisée à température ambiante en chambre humide durant 16 h. Les lames sont ensuite rincées trois fois 10 minutes dans du PBS (0,1 M pH 7,4) puis incubées avec 400 µL d'anticorps secondaires conjugués à la fluorescéine ou à la rhodamine dilués au 1/300<sup>ème</sup> dans le même tampon PBS/Triton. Les anticorps secondaires utilisés sont : F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (FITC) et F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (TRITC) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). L'incubation est réalisée à température ambiante en chambre humide pendant 2 heures. Une lame servant de contrôle négatif est incubée uniquement avec l'anticorps secondaire. Les lames sont ensuite rincées brièvement dans du PBS (0,1 M pH 7,4) et immédiatement montées sous lamelles (Labonord) en présence de 200 µL de milieu de montage (1 g/L de paraphényl-N-diamine diluée dans 25 % de PBS (0,1 M pH 7,4) et 75 % de glycérol).

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Axioplan 2 (Carl Zeiss Light Microscopie, Göttingen, Allemagne) muni des filtres 494 nm/518 nm (spectre d'excitation et d'émission de la fluorescéine), 555/580 (TRITC) et 372/456 (Dapi) et équipé d'une lampe Atto Arc 2 HBO 100W. Les observations sont faites aux objectifs Plan-NEOFUAR 20X/0,50 et 40X/0,75. Les images sont enregistrées à l'aide d'une caméra AxioCam HRc munie d'un objectif TV2/3''C 0,63X.

### III.B.3. Microscopie électronique

Après le sacrifice par décapitation, les glandes surrénales (n = 3) sont prélevées et immédiatement fixées dans du PB, 0,1 M pH 7,4, contenant 3 % de glutaraldéhyde durant 2

heures. Après une postfixation d'une heure dans 1 % d'osmium tétroxyde dilué dans du PB, les surrénales sont déshydratées dans de l'acétone et incluses dans l'Epon de façon conventionnelle (48 h de polymérisation à 60°C). Des coupes ultrafines (80-90 nm) sont ensuite réalisées à partir des blocs d'Epon, placées sur des grilles de cuivre à 200 mèches, contre-colorées classiquement avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb, puis finalement observées dans un microscope électronique Jeol CX 100.

L'observation a été effectuée au Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire de Lille 1 (CCMIC). Des photos de 5 CC A et 5 CC NA par surrénale, et localisées globalement dans la région centrale de la glande, ont été prises à un grossissement de 10 000. Les plans films obtenus ont été développés puis scannés afin de permettre le traitement informatique des caractéristiques structurales des CC. La distinction des deux phénotypes de CC est basée sur des critères morphologiques décrits dans la littérature (Coupland 1965, Gorgas et Bock 1976). Les granules de sécrétion présentent notamment un profil de précipitation différent selon qu'ils contiennent de l'A ou de la NA.

#### III.B.4. Macroarrays

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Youssef Anouar de l'unité INSERM U413 (Mont-Saint-Aignan), nous avons testé l'activité transcriptionnelle des surrénales issues d'animaux FR50 et témoins à l'aide de « macroarray » contenant 384 gènes d'origines différentes : 1) premièrement, 230 gènes surexprimés par des cellules PC12 (phéochromocytome de rat) traitées au PACAP (Grumolato *et al.*, 2003b) ont été sélectionnés par la technique d'hybridation suppressive soustractive (Diatchenko *et al.*, 1996) ; 2) deuxièmement, 120 gènes surexprimés par ces mêmes cellules dans les mêmes conditions, ont été sélectionnés à l'aide d'un microarray du NIH (National Institute of Health, Bethesda) dérivant d'une banque embryonnaire de souris ; 3) troisièmement, 34 gènes contrôles ont été ajoutés. L'ADN des 384 gènes est déposé en triplicate sur une membrane de nylon grâce à un robot « spotter » (Eurogentec, Seraing, Belgique). La membrane est préalablement incubée 5 min sur du papier Whatman imbibé de tampon de dénaturation (NaOH 1,5 M, NaCl 0,5 M), puis neutralisée dans du PBS 0,1 M pH 7,4 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 75 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 25 mM), lavée à l'eau et séchée.

Les ARN totaux sont extraits des surrénales selon le procédé de Chomczynski et Sacchi (1987) puis purifiés grâce au kit « RNeasy Mini Kit » (Qiagen). Ces ARN sont hybridés à une amorce oligodT et sont rétrotranscrits par la Superscript II en présence de [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP. Chacune des deux sondes radioactives est alors utilisée pour hybrider les membranes de « macroarray ». Les membranes sont

analysées en utilisant le STORM phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) et les images obtenues sont traitées par le logiciel d'analyse protéomique Z3 (Compugen, Sunnyvale, USA) qui a été adapté pour cette étude. Les résultats sont présentés sous forme de tableaux qui expriment le nombre de gènes sous-exprimés (figure 34), le nombre et la catégorie des gènes sous-exprimés (figure 34), ainsi que le rapport d'expression des gènes identifiés entre les animaux FR50 et contrôles (rapport FR/T) (tableau 5 et 6).

#### III.B.5. Activité acétylcholine estérase

L'activité AChE a été évaluée suivant la méthode indirecte de coloration élaborée par Karnovsky et Roots (Karnovsky and Roots, 1964). Brièvement, les coupes de 14  $\mu\text{m}$  montées sur lames poly-L-lysine (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) sont chauffées 45 secondes à 60°C afin de favoriser l'adhérence du tissu, fixées 15 minutes dans de l'acétone, puis séchées à l'air 30 minutes. Les tissus sont ensuite incubés 45 minutes à 37°C dans du tampon acétate (50 mM, pH 5) contenant 2 mM d'acétylthiocholine iodide, 2 mM de sulfate de cuivre, 10 mM de glycine, et 20  $\mu\text{M}$  de tétraisopropylpyrophosphoramide (iso-OMPA, Sigma), qui inhibe les activités AChE non-spécifiques. Après 5 rinçages, les sections sont incubées dans du tampon acétate contenant 1,25 % de sodium sulfide, puis transférées dans une solution à 1 % de nitrate d'argent. Des contrôles négatifs ont été réalisés : 1) par omission du substrat acétylthiocholine ; et 2) en présence de  $10^{-4}$  M d'ésérine<sup>36</sup> (Sigma), et n'ont montré aucune réaction dans ces conditions. Afin de s'assurer de l'occurrence de la réaction, un contrôle positif a été réalisé en incubant des coupes en absence d'iso-OMPA. Quatre sections situées dans la région médiane de la médulla ont été analysées pour chaque surrénale (n = 4) à l'aide d'un densitomètre Bio-Rad GS-700 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La valeur de densité optique (DO) rapportée à la surface de la médulla analysée a été utilisée pour exprimer l'intensité du marquage.

#### III.B.6. Chromatographie Liquide à haute performance

Pour la quantification des catécholamines dans le plasma et les urines, une extraction sur alumine précède le dosage : un mélange de 700  $\mu\text{L}$  de plasma ou 25  $\mu\text{L}$  d'urine additionnés de 675  $\mu\text{L}$  d'eau distillée, 790  $\mu\text{L}$  de tampon Tris (0,5 M pH 8,6), 10 ng de DHBA (dihydroxy benzyl amine, standard interne qui permet de connaître le rendement de l'extraction) dans 10  $\mu\text{L}$  d'eau

---

<sup>36</sup> Inhibiteur des AChE spécifiques

distillée, et 12 mg d'alumine activée, est agité 20 min en chambre froide (4°C). Après rinçage à l'eau distillée, et élimination du surnageant, 100 µL d'acide perchlorique 0,2 M sont ajoutés. Une centrifugation de 20 min à 16000 tr/min permet de récupérer les catécholamines dans le surnageant qui est alors prêt à être injecté dans la colonne. Les glandes surrénales sont dilacérées et soniquées 15 secondes dans 1 mL d'acide perchlorique, puis centrifugées 20 minutes à 14000 g à 4°C. Le surnageant est ensuite dilué 50 fois dans de l'acide perchlorique et alors utilisé pour le dosage.

L'appareil est constitué d'une pompe P4000 (Spectra Physics Analytical, dégazeur automatique, débit réglé à 1 mL/min, pression à 80 bars), d'une colonne Altex Ultrasphère ODS 250 x 4.6 mm, d'un détecteur ampérométrique LC-4C BAS (BioAnalytical Systems Inc., électrode de travail en carbone vitreux) et d'un intégrateur Chromjet Spectra Physics. La phase utilisée, tant pour les dosages surrénaux que plasmatiques, est celle de MEFFORD (Mefford et coll., 1981). Elle est composée d'acétate de sodium (0.1 M), d'acide citrique (0.02 M), de méthanol (10%), d'EDTA (50 mg/L), et de sulfate d'octyle (100 mg/L), et est filtrée et dégazée avant utilisation.

#### III.B.7. Mesure de la pression artérielle par pléthysmographie

La mesure de la pression artérielle a été effectuée sur des rats témoins (n=6) et FR50 (n=6) âgés de 6 mois à l'aide d'un pléthysmomètre Leticia LE5001. L'utilisation adéquate du pléthysmomètre nécessite de placer les rats dans des boîtes de contention, et, avant toute mesure, dans une étuve à 37°C pendant 10 minutes afin d'augmenter la vasodilatation caudale. La bague du pléthysmomètre est ensuite placée sur la queue du rat, le plus proche possible de son origine, et le rythme cardiaque ainsi que les pressions systolique et diastolique sont mesurées. Douze mesures sont réalisées quotidiennement pour chaque rat. Les animaux ont tout d'abord été acclimatés à cette manipulation pendant une semaine (afin de les habituer à la boîte de contention et au pléthysmomètre, qui constituent une situation stressante). La semaine suivante, les résultats sont enregistrés et moyennés sur 5 jours. Il est à noter que, dans nos conditions expérimentales et compte tenu du matériel utilisé, la pression diastolique est aux limites du seuil de détection.

#### III.B.8. Statistiques et outils informatiques

L'ensemble des données collectées au cours des manipulations décrites ci-dessus a été soumis au test statistique de Student (ou « t test ») afin de vérifier leur degré de significativité. Les mesures de surface et de densité ont été réalisées, soit sur des photographies argentiques acquises numériquement (microscopie électronique), soit sur des photos numériques (microscopie à

fluorescence), soit sur des scans de lames (histologie, activité AChE), à l'aide du logiciel MultiAnalyst (Biorad).

### III.C. Résultats

Les résultats présentés ci-dessous font l'objet d'un manuscrit en préparation.

#### III.C.1. Analyse biométrique

Le poids corporel ainsi que la masse des surrénales des animaux FR50 sont réduits à 8 mois (poids corporel :  $536 \pm 21$  g chez les animaux témoins vs.  $439 \pm 12$  g chez les animaux FR50,  $p = 0,0005$  ; poids des surrénales :  $33,12 \pm 2,13$  mg chez les animaux témoins vs.  $25,34 \pm 2,9$  mg chez les animaux FR50,  $p = 0,046$  ; figure 28A et B). Cependant, la masse relative (au poids corporel) des glandes surrénales n'est pas différente chez les animaux FR50 et témoins à l'âge adulte ( $0,065 \pm 0,006$  mg/g chez les animaux témoins vs.  $0,058 \pm 0,007$  mg/g chez les animaux FR50,  $p = 0,48$  ; figure 28C). Par ailleurs, tandis que la masse relative du tissu adipeux blanc périrénal est réduite chez les animaux FR50 ( $12,81 \pm 0,9$  mg/g témoins vs.  $8,68 \pm 0,63$  mg/g FR50,  $p = 0,004$  ; figure 28D), celle du tissu adipeux brun inter-scapulaire est augmentée ( $1,26 \pm 0,06$  mg/g témoins vs.  $1,54 \pm 0,06$  mg/g FR50,  $p = 0,004$  ; figure 28E).

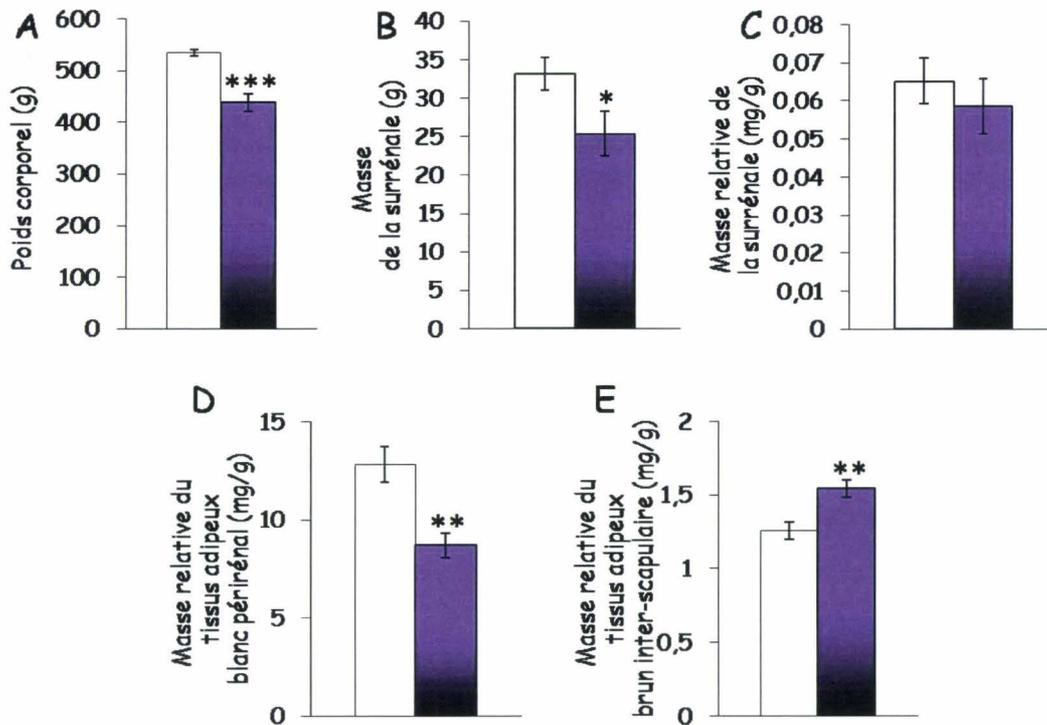


Figure 28 : Données biométriques chez le rat mâle âgé de 8 mois. Le poids corporel (A), la masse de la surrénale (B), la masse de la surrénale relative au poids corporel (C), ainsi que la masse relative du tissu adipeux blanc périrénal (D) et brun inter-scapulaire (E) sont présentés chez les

animaux témoins (colonnes vides) et FR50 (colonnes pleines). \*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$  témoins vs. FR50

### III.C.2. Morphologie de la médullosurrénale

Afin de déterminer la morphologie de la médullosurrénale chez les animaux FR50 à l'âge adulte, nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre le GAP-43 (exprimé par les CC NA et les neurones sympathiques) et la PNMT (exprimée par les CC A). Chez les animaux témoins, Les CC A constituent près de 60 % de la surface de la médulla, tandis que les CC NA ne représentent que 10 % (figure 29C). La proportion de CC NA et A n'est pas modifiée dans la médullosurrénale des animaux FR50 (NA :  $12,88 \pm 1,01$  % témoins vs.  $10,98 \pm 1,29$  % FR50,  $p = 0,29$  ; A :  $57,3 \pm 3,13$  % témoins vs.  $59,83 \pm 1,03$  % FR50,  $p = 0,47$  ; figure 29D). Cependant, les îlots de CC NA sont plus petits et plus nombreux chez les animaux FR50 (figure 29A) comparé aux animaux témoins (figure 29B). Ainsi, chez les animaux dénutris, la surface relative des îlots de CC NA est réduite de 40 % ( $0,62 \pm 0,12$  % chez les animaux témoins vs.  $0,27 \pm 0,03$  % chez les animaux FR50,  $p = 0,028$ ), alors que leur nombre relatif est augmenté de 40 % ( $1,53 \pm 0,06$  chez les animaux témoins vs.  $2,02 \pm 0,17$  chez les animaux FR50,  $p = 0,015$ ) comparativement aux animaux témoins (figure 29D).

Les altérations morphologiques qui touchent l'organisation des îlots de CC NA chez les animaux FR50 au cours du développement postnatal persistent à l'âge adulte. Ces modifications représentent donc des adaptations irréversibles du développement de la médullosurrénale à l'environnement nutritionnel périnatal défavorable.

La glande surrénale présente globalement la même organisation qu'au sevrage, à savoir de larges groupes de cellules GAP-43-positives (NA), retrouvés en nombre relativement restreint (figure 29A), et inclus dans la masse de CC PNMT-positives (A) qui compose majoritairement la médulla. De la même façon (figure 29B), la structure de la médulla chez les animaux FR50 est comparable à celle observée au sevrage, l'immunoréactivité au GAP-43 étant retrouvée dans des îlots manifestement plus petits et plus nombreux que chez les animaux témoins. Ainsi, les mesures de la surface (figure 29C) des îlots NA nous permettent de conclure statistiquement à la persistance, chez l'adulte, des modifications architecturales induites précocement dans la médullosurrénale des animaux FR50, à savoir une réduction de la surface (absolue et relative) des îlots de CC NA ainsi qu'une augmentation du nombre (relatif et absolu) d'îlots.

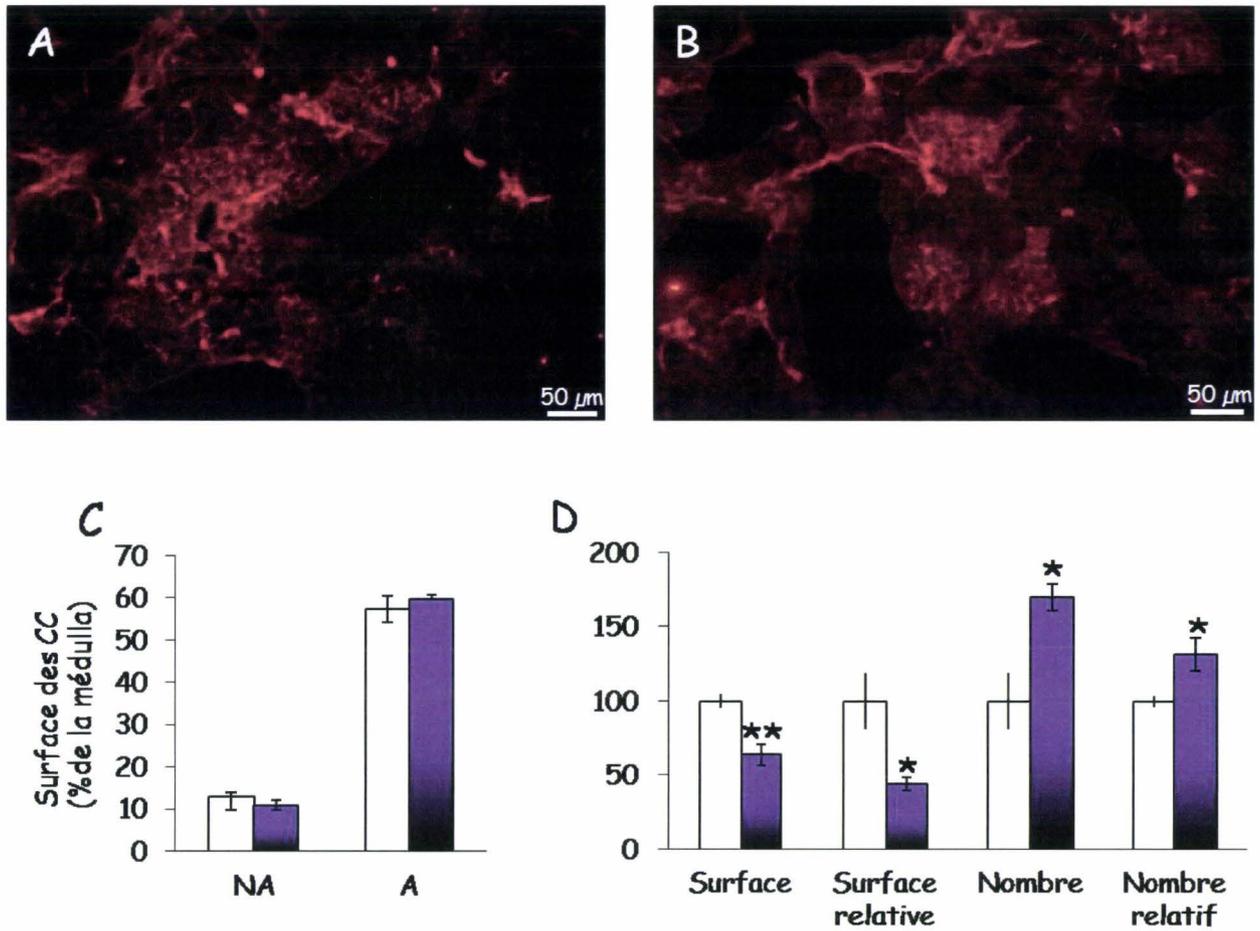
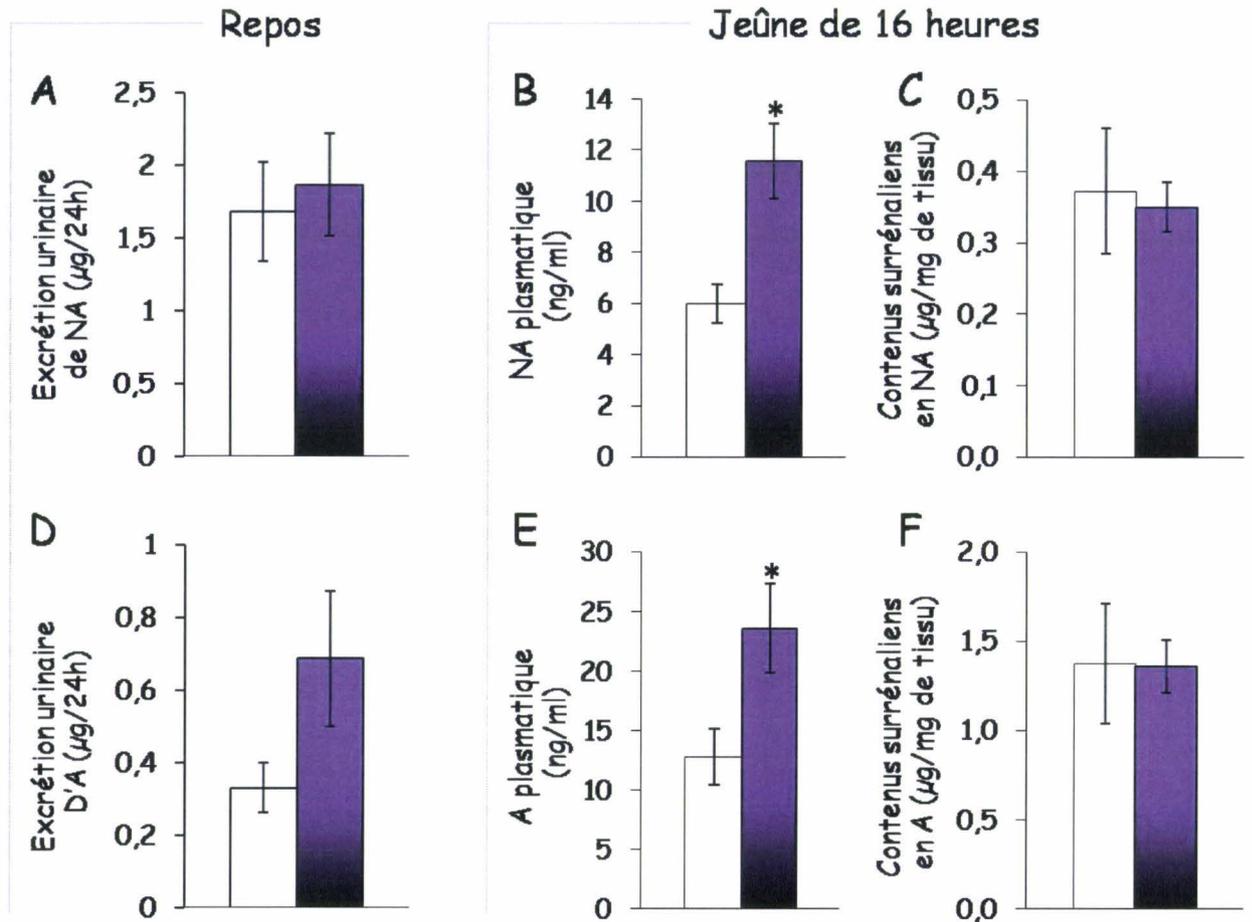


Figure 29 : Morphologie des îlots de cellules chromaffines noradrénergiques dans les surrénales adultes. A et B : microphotographies des îlots de CC NA immunoréactives au GAP-43 dans les surrénales issues d'animaux témoins (A) et FR50 (B). C : surface totale des cellules NA et A dans la médulla des animaux témoins (colonne vide) et FR50 (colonne pleine). Les résultats sont présentés en pourcentages de la surface de la médulla. D : surface et nombre (absolus et relatifs à la surface de la médulla) des îlots de CC NA dans les surrénales témoins (colonnes vides) et FR50 (colonnes pleines). Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs retrouvées chez les animaux témoins. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  témoins vs. FR50. Barres d'échelle = 50 μm.

III.C.3. Activité de la glande médullosurrénale

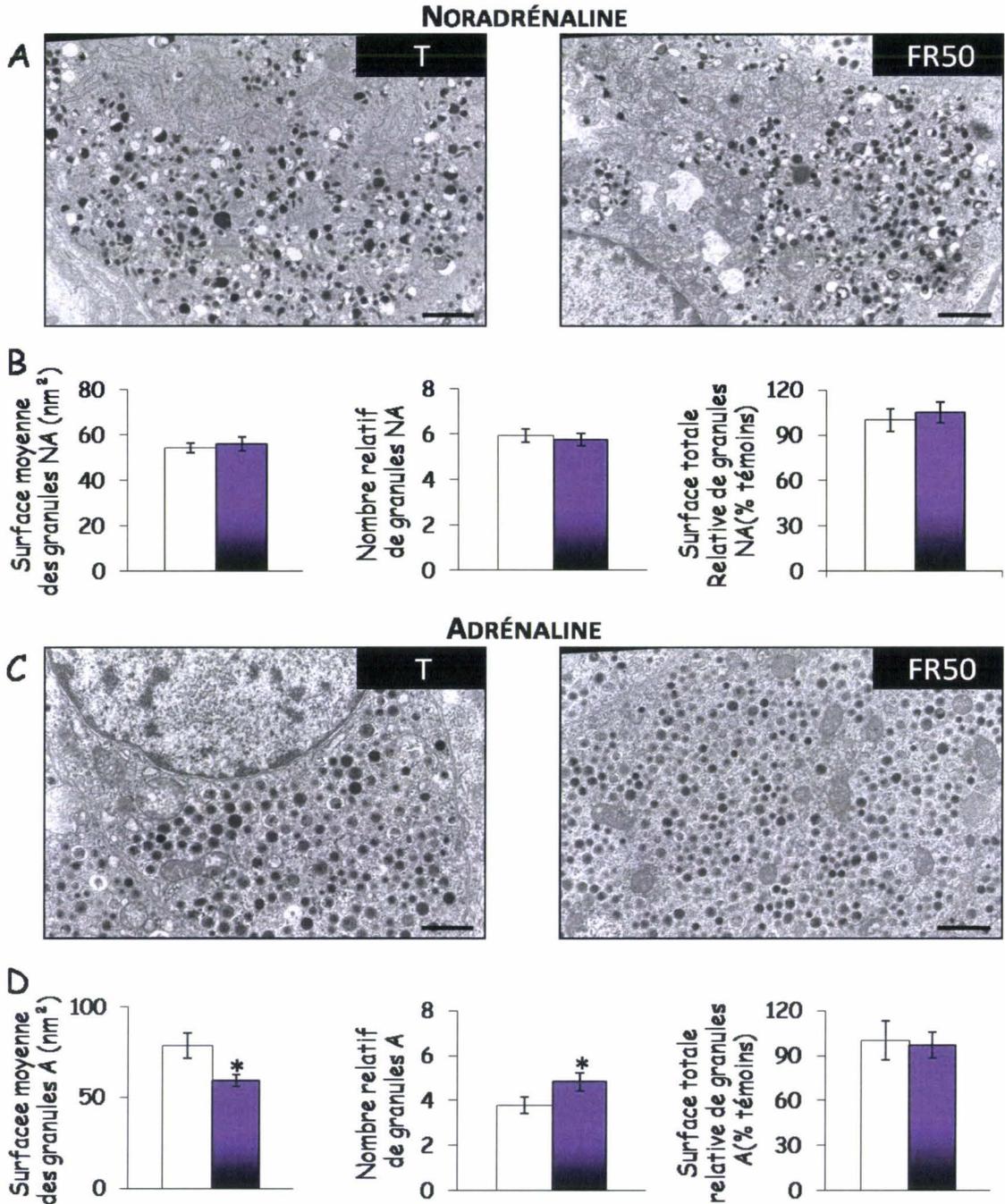
**Figure 30 :** *Activité de la glande surrénale au repos ainsi qu'en réponse à un jeûne de 16 h. Les taux de catécholamines ont été évalués par HPLC en conditions de repos dans les urines (A et D), ainsi qu'après un jeûne de 16 h dans le plasma (B et E) et les surrénales (C et F) chez les animaux témoins (colonnes vides) et FR50 (colonnes pleines). \*,  $p < 0,05$  témoins vs. FR50*

Afin d'évaluer si de telles altérations morphologiques peuvent avoir des répercussions sur l'activité fonctionnelle de la glande, nous avons dosé les catécholamines urinaires dans des conditions de repos et mesuré les taux plasmatiques et surrénaliens en réponse à un jeûne de 16 h. Aucune différence statistique n'est observée concernant l'excrétion urinaire des catécholamines dans des conditions de repos entre les animaux témoins et FR50 (NA :  $1,68 \pm 0,34$  µg/24 h chez les animaux témoins vs.  $1,86 \pm 0,36$  µg/24 h chez les animaux FR50,  $p = 0,73$ ; A :  $0,33 \pm 0,07$  µg/24 h chez les animaux témoins vs.  $0,69 \pm 0,19$  µg/24 h chez les animaux FR50,  $p = 0,22$  ; figure 30). Ceci peut être majoritairement imputable au trop faible nombre d'animaux inclus dans cette étude ( $n = 5$ ) et à la forte variabilité inter-individuelle. Pour confirmer ou infirmer ces

résultats préliminaires, un élevage d'animaux plus conséquent a été entrepris, et les animaux âgés de 8 mois ont été sacrifiés récemment. Cependant, les dosages (urinaires, plasmatiques et surrénaux) sont en cours de réalisation, et les résultats ne peuvent donc pas figurer dans cette thèse. Toutefois, en réponse à un jeûne de 16 h les taux plasmatiques de NA et de A sont augmentés de façon significative chez les animaux FR50 (NA :  $5,98 \pm 0,76$  ng/ml témoins vs.  $11,57 \pm 1,45$  ng/ml FR50,  $p = 0,011$  ; A :  $12,82 \pm 2,36$  ng/ml témoins vs.  $23,59 \pm 3,71$  ng/ml FR50,  $p = 0,045$ ), tandis que les contenus surrénaux ne sont pas modifiés (NA :  $0,37 \pm 0,09$  µg/mg témoins vs.  $0,35 \pm 0,03$  µg/mg FR50,  $p = 0,94$ ; A :  $1,38 \pm 0,34$  µg/mg témoins vs.  $1,36 \pm 0,15$  µg/mg FR50,  $p = 0,97$ ). Ces résultats montrent une capacité accrue de la médullosurrénale des animaux FR50 à répondre à un stress métabolique.

#### III.C.4. Microscopie électronique

Les résultats de microscopie électronique montre que l'ultrastructure des granules de sécrétion des CC A est affectée par la dénutrition périnatale chez l'adulte (figures 30 et 31). En effet, chez les animaux FR50, les granules de sécrétion des CC A présentent une réduction de leur surface moyenne ( $78,7 \pm 7$  nm<sup>2</sup> control vs.  $59,3 \pm 3,3$  nm<sup>2</sup> FR50,  $p = 0,018$ ) et une augmentation de leur nombre relatif ( $3,8 \pm 0,4$  control vs.  $4,8 \pm 0,4$  FR50,  $p = 0,046$  ; figure 31). Par ailleurs, la réduction globale de la surface des granules A est due à la réduction de la proportion des granules de taille moyenne (50 à 100 nm<sup>2</sup>) et de grande taille (> 150 nm) et à l'augmentation concomitante de la proportion de granules de faible taille (< 50 nm<sup>2</sup>) (figure 32). Cependant, les altérations de la taille et du nombre des granules A se compensent, et en conséquence, la surface totale relative représentée par les granules chromaffines dans les cellules A n'est pas modifiée (figure 31D). La dénutrition maternelle semble cependant ne pas affecter la densité des granules des CC A (figure 32). Par contre, aucune altération des granules de sécrétion n'est observée pour les CC NA chez les animaux FR50 (figures 30 et 31). Ainsi, à l'âge adulte, il apparaît que la dénutrition maternelle périnatale programme de manière spécifique le développement des granules de sécrétion des CC A.



**Figure 31** : Ultrastructure des granules chromaffines à l'âge adulte. A et C : photographies prises en microscopie électronique ( $\times 10\ 000$ ) de cellules chromaffines NA (A) et A (C) chez des animaux témoins et FR50. B : graphiques présentant la surface moyenne (nm<sup>2</sup>), le nombre relatif à la surface de cellule mesurée (unités arbitraires), et la surface totale relative (% des témoins) des granules chromaffines NA chez des animaux témoins (colonnes vides) et FR50 (colonnes pleines). D : graphiques présentant la surface moyenne (nm<sup>2</sup>), le nombre relatif à la surface de cellule mesurée (unités arbitraires), et la surface totale relative (% des témoins) de granules chromaffines A chez des animaux témoins (colonnes vides) et FR50 (colonnes pleines). \*,  $p < 0,05$  témoins vs. FR50. Barre d'échelle : 100 nm.

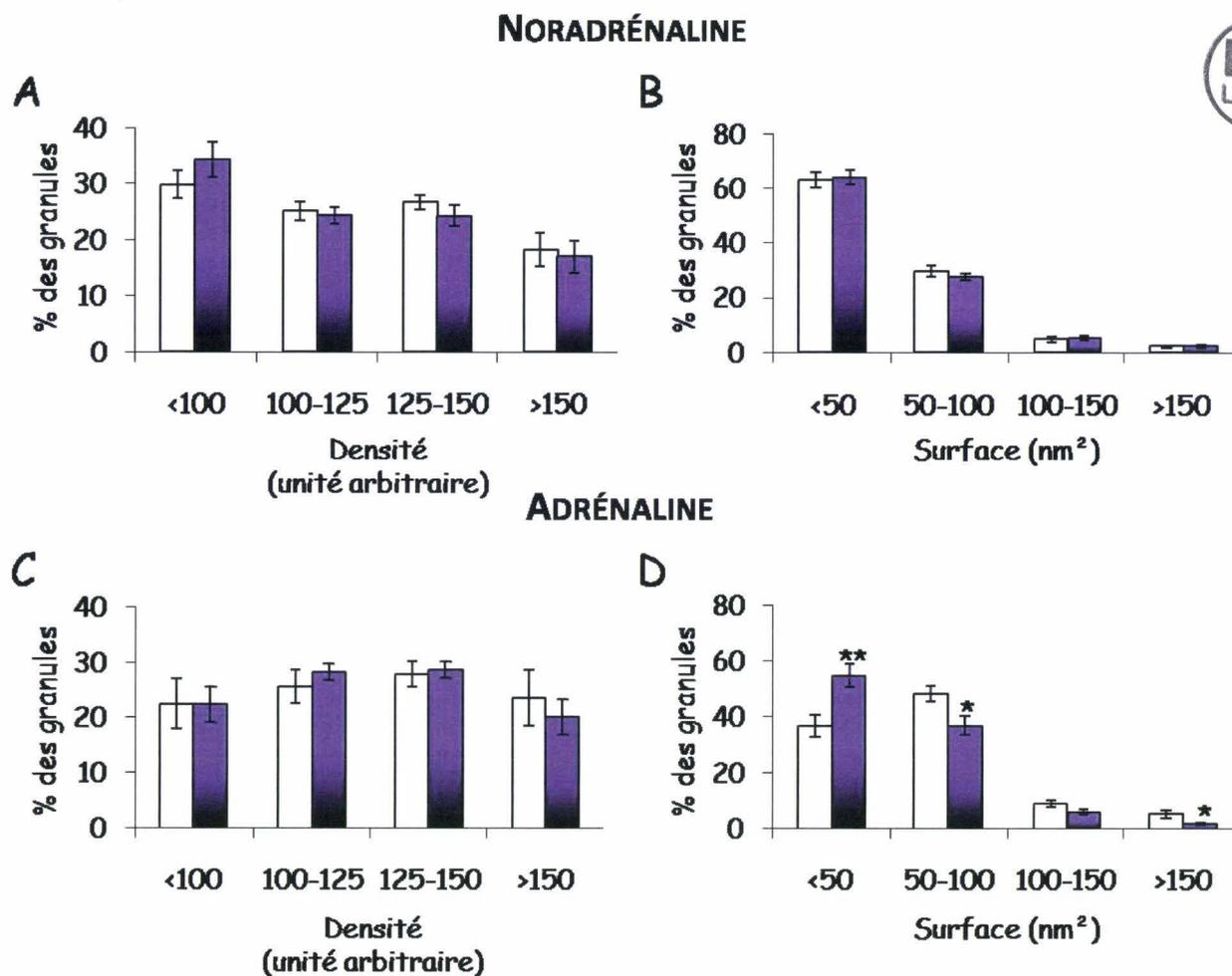
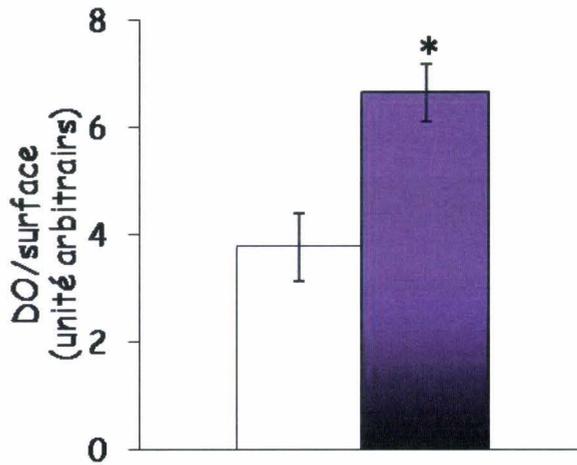


Figure 32 : Répartition des granules chromaffines en fonction de leur densité et de leur surface. A et C : diagrammes présentant la répartition (%) des granules chromaffines NA (A) et A (C) en fonction de leur densité chez les animaux témoins (colonne vides) et FR50 (colonne pleines). B et D : diagrammes présentant la répartition (%) des granules chromaffines NA (B) et A (D) en fonction de leur taille. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  témoins vs. FR50

### III.C.5. Activité acétylcholine estérase

Afin d'évaluer l'intensité de l'innervation préganglionnaire de la médulla, nous avons réalisé des marquages colorimétriques de l'activité AChE (figure 33). De la même façon qu'à P21, cette activité est augmentée de l'ordre d'un facteur deux dans les surrénales issues d'animaux FR50 adultes ( $3,78 \pm 0,63$  unités de DO témoins vs.  $6,66 \pm 0,54$  unités de DO FR50,  $p = 0,013$ ).



**Figure 33** : *Activité acétylcholine estérase dans la médullosurrénale à 8 mois.* La densité optique de la coloration au nitrate d'argent a été rapportée à la surface de la médulla analysée chez les animaux témoins (colonne vides) et FR50 (colonne pleine). \*,  $p < 0,05$  témoins vs. FR50

### III.C.6. Expression génique

Afin d'évaluer l'activité transcriptionnelle des glandes surrénales FR50, et, éventuellement, d'identifier des acteurs moléculaires exprimés différemment lors de la dénutrition maternelle, nous avons réalisé des expériences de « macroarrays » à l'aide des mêmes puces que celles utilisées à P21 (figure 34). Sur les 384 gènes présents sur le « macroarray », 129 (soit 33,6 %) sont réprimés dans les surrénales des animaux FR50 adultes, contre un seul à P21, tandis qu'aucun gène n'est surexprimé à 8 mois, contre 20 (5,2 %) au sevrage. Ainsi, la dénutrition maternelle, qui induit au sevrage la surexpression d'un certain nombre de gènes impliqués notamment dans la différenciation neuroendocrine et l'exocytose, semble programmer un profil global de sous-expression dans la glande surrénale chez l'adulte (figure 34A). De plus, l'expression des gènes surexprimés au sevrage dans la surrénale des animaux FR50 semble majoritairement être normalisée à 8 mois (tableau 5), excepté pour la *Dnmt3A*, *MCM2*, *Lmo1*, *PLAG2*, et *Slit 2* qui sont maintenant sous-exprimés. Par ailleurs, il est à noter qu'un grand nombre des gènes sous-exprimés est impliqué : 1) dans le cytosquelette et le trafic vésiculaire ; 2) dans la matrice cellulaire et l'adhésion ; 3) dans le métabolisme ; et enfin 4) dans la prolifération (figure 34B et C). De plus, la forte proportion de gènes non identifiés parmi les gènes sous-exprimés suggère l'existence de nombreux facteurs encore inconnus et jouant potentiellement un rôle dans la plasticité et la régulation de l'activité des cellules de la glande surrénale (chromaffines et corticales). Le tableau 6 présente le détail des gènes sous-exprimés dans les surrénales des animaux FR50.

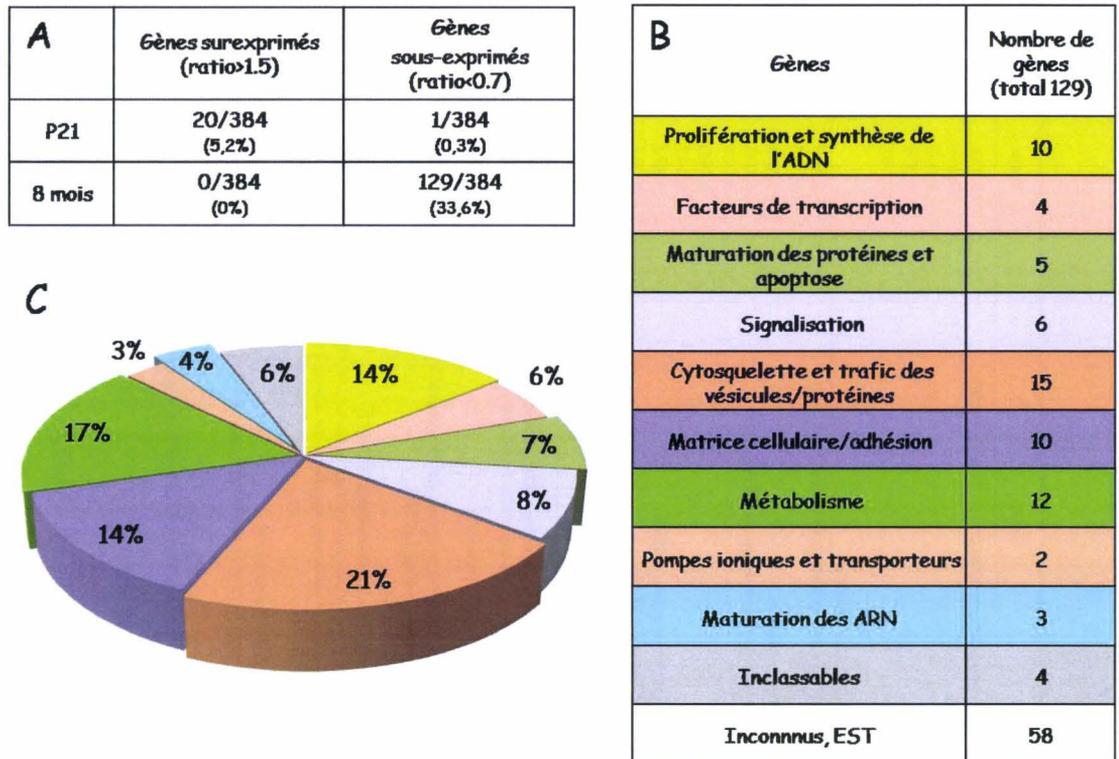


Figure 34 : Expression génique dans la glande surrénale des animaux adultes. A : comparaison de l'expression de 384 gènes, régulés par le PACAP dans les cellules PC12, au sevrage et à 8 mois. B : catégories de gènes sous-exprimés dans les surrénales issues d'animaux FR50 adultes. C : répartition des gènes identifiés sous-exprimés chez les animaux FR50 adultes

Fonction	Gènes (homologies)	FR/T P21	FR/T 8mois	Genbank
Prolifération et synthèse de l'ADN	DNA methyltransferase 3A (Dnmt3A)	1,524	0,615	AW549977
	Extracellular proteinase inhibitor (Expi) : WNDM1	1,557		AU040587
	Growth associated protein 43 (GAP43)	1,888	0,882	AW556809
	Mini chromosome maintenance deficient 2 (MCMd2)	1,869	0,605	AW553939
Transcription et régulation	Lmo1 gene for putative human LMO1 homologue	1,586	0,548	AU015284
	Antigen identified by monoclonal antibody MRC-OX	0,665	0,726	AW558554
	Pleiomorphic adenoma gene-like 2 (PLAGL2)	1,628	0,672	AW556843
	Zinc finger protein 265	1,533	0,873	NP976225
Signalisation	EST highly similar to Faciogenital dysplasia protein	1,716	0,936	AK040910
	Membrane interacting protein of RGS16 (MIR16)	1,62	1,025	AAH70897
	Phafin	1,75	0,936	AAL30770
	SH3 domain protein 2A	1,808	0,867	AW555077
	Transforming growth factor beta 2 (TGFB2)	1,891	0,846	C86748
Cytosquelette et trafic des vésicules et protéines	Adducin 3 (gamma)	1,588	0,746	AW549619
	Chromogranin B (CgB)	1,79	1,02	AAH14736
	Gelsolin	1,64	0,891	AW548858
	Filamin-like	1,552	0,808	AW557788
	Neurofilament 3 (NeuF3)	1,662	1,059	NM017029
Inclassables	Mesoderm specific transcript (Mst)	1,88	0,821	AW553763
	Neurogenic extracellular Slit protein (Slit2)	1,627	0,578	AAH59267
Inconnu	EST, no homology	1,562	0,661	CT6098

Tableau 5 : Niveau d'expression à 8 mois des gènes surexprimés au sevrage chez les animaux FR50

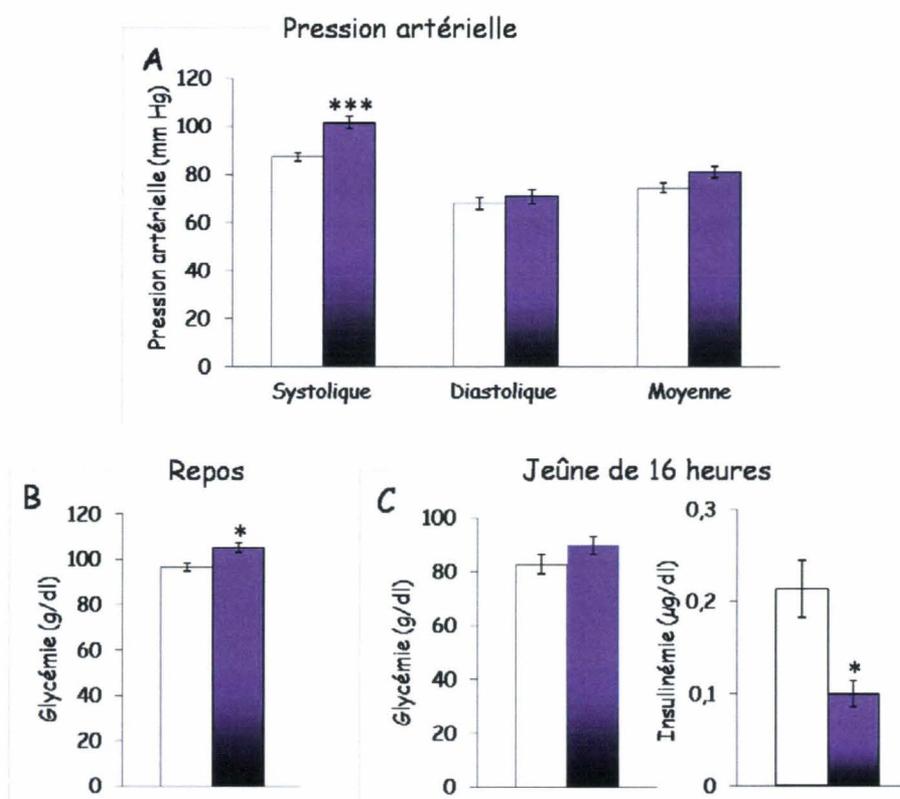
Gènes	Ratio	Numéro d'accession	Gènes	Ratio	Numéro d'accession
<b>Prolifération et synthèse de l'ADN</b>					
polyomyositis/scleroderma autoantigen 1	0,655	AU014747	Mus musculus synaptosomal associated protein, 91 kDa (Snap91)	0,551	
growth arrest specific 1 (ESTs) new DnaI3a DNA methyltransferase 3A	0,645	AW554898	alpha actinin 1 A	0,635	AW544340
mini chromosome maintenance deficient 2 (5. cerevisiae)	0,615	AW549977	alpha actinin 4	0,600	AW552978
H2A histone family, member Z	0,605	AW553939	NAP 22	0,554	AW545587
ESTs, Weakly similar to CGA2 MOUSE CYCLIN A2 [Mus musculus]	0,586	AU020259	NECAP 2	0,537	AW538517
cyclin A2	0,481	AW550094	<b>Matrice cellulaire/adhésion</b>		
thymopoietin	0,443	AW550700	Lutheran blood group (Aubberger b antigen included)	0,663	AW553617
Mus musculus growth arrest specific 1 (Gast1)	0,644	NM008086	clusterin	0,650	AU041878
Rattus norvegicus Cyclin G1 (Cng1), mRNA	0,605		melanoma cell adhesion molecule	0,599	AW555994
<b>Facteurs de transcription</b>			secreted acidic cysteine rich glycoprotein (ostéonectine)	0,595	AW536169
zinc finger protein 238	0,653	AU015326	embigin	0,545	AW536238
GATA-binding protein 3	0,623	C81309	lamin B1	0,496	AW538369
inhibitor of DNA binding 2	0,584	AU041192	attractin	0,645	
GATA-binding protein 2	0,491	AW538547	Rattus norvegicus heparanase (Hep) mRNA	0,620	
<b>Maturation des protéines et apoptose</b>			Mus musculus Ascl3 gene, Ccgp1 gene	0,564	
ring-box 1	0,654	AU040781	Rattus norvegicus L1 retrotransposon ORF2 m RNA	0,483	
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 2	0,592	AU018025	<b>Métabolisme</b>		
HSP 40 (Dna J) Mus musculus	0,661	NM0214223	Rattus norvegicus mitochondrial cytochrome oxidase subunits I, II, III genes	0,664	
Mus musculus similar to Death-associated protein kinase 1	0,635	NM0296532	Rattus norvegicus cytochrome-c oxidase, subunit I (Cox1b)	0,597	
Mus musculus Bcl2-associated atohomogene 1 (Bag1),	0,550		mitochondrial cytochrome C oxidase subunit II	0,595	
<b>Signalisation</b>			Rattus norvegicus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	0,593	
serine/threonine kinase 5	0,661	AA410169	Rattus sp. Cytochrome oxidase subunit I mRNA	0,584	
Ephrine receptor A1	0,594	AW545284	hepatic steroid hydroxylase II A2	0,583	
ErbB2 interacting protein	0,590	AW537855	Rat mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit II (CoxII)	0,572	
ESTs, Weakly similar to JAK3 MOUSE TYROSINE-PROTEIN KINASE JAK3 [Mus musculus]	0,588	AU022583	Rat mRNA for glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)	0,569	
Protéine G alpha q	0,582	AU042121	Mus musculus serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1	0,569	
aphysia ras-related homolog B (RhoB)	0,561	AW538176	AGL (glc debranching enzyme)	0,643	C77182
Petite homologie avec: Mus musculus tub gene for tubby protein (génomique)	0,538		ornithine decarboxylase antizyme inhibitor	0,538	AW558751
<b>Cytosquelette et trafic des vésicules/protéines</b>			UDP-Gal-betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 3	0,461	AW544186
Rattus norvegicus thymosin, beta 10 (Tmsb 10), mRNA	0,664		<b>Canaux ioniques et transporteurs</b>		
Rattus norvegicus Chromogranin B	0,663		potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	0,657	C86468
Dementine	0,650		P450 (cytochrome) oxidoreductase	0,615	AU016777
Rattus norvegicus Chromogranin B	0,636		<b>Maturation des ARN</b>		
Mus musculus kinesin heavy chain member 4 (Kif4)	0,633		Mus musculus DEAQ RNA-dependent ATPase DQX1 (Dqc1) mRNA	0,625	
Rattus norvegicus Chromogranin B	0,630		Mus musculus, Similar to eukaryotic translation elongation factor 1 delta	0,570	
Rat cytokeratin 8 polypeptide mRNA	0,624		Mus musculus mRNA for GANP protein	0,476	
partie de: Mouse cytoskeletal mRNA for beta-actin	0,622		<b>Inclassables</b>		
petite homologie Rattus norvegicus Vesicle-associated membrane protein	0,579		Xpr1	0,661	C76098
Karyopherin (importin) alpha 2 Rattus norvegicus	0,561		amyloid beta (A4) precursor protein	0,628	AW552701
			protein phosphatase alpha 2 (PPalpha2)	0,562	AU016256
			Mus musculus neurogenic extracellular sili' protein (Sili2)	0,578	

Tableau 6 : Gènes sous-exprimés dans les surrénales FR50 adultes

## III.C.7. Métabolisme

Afin d'évaluer les effets de la dénutrition maternelle périnatale sur les paramètres cardiovasculaires, nous avons mesuré la pression artérielle chez des rats âgés de 6 mois (figure 35A). Les animaux FR50 présentent une augmentation de la pression systolique ( $87,38 \pm 1,77$  mm Hg témoins vs.  $101,55 \pm 2,59$  mm Hg FR50,  $p = 0,001$ ) sans modification apparente de la pression diastolique et moyenne (figure 35A). Ainsi, la dénutrition maternelle périnatale affecte, chez l'adulte, le système cardiovasculaire avec l'apparition d'un signe d'hypertension artérielle.

En ce qui concerne le métabolisme glucidique, les animaux FR50 adultes âgés de 8 mois présentent une hyperglycémie en période diurne ( $96,42 \pm 1,71$  g/dl chez les animaux témoins vs.  $105,2 \pm 2,05$  g/dl chez les animaux FR50,  $p = 0,014$ ; figure 35B). Après un jeûne nocturne de 16 heures, la glycémie des rats FR50 est identique à celle des témoins, tandis que les taux d'insuline sont réduits de moitié ( $0,21 \pm 0,03$   $\mu\text{g/dl}$  chez les animaux témoins vs.  $0,1 \pm 0,01$  chez les animaux FR50  $\mu\text{g/dl}$ ,  $p = 0,015$ ; figure 35C). La dénutrition maternelle périnatale semble donc avoir des répercussions sur le métabolisme glucidique à l'âge adulte.



**Figure 35 :** Données métaboliques chez le rat mâle adulte. A: pression artérielle systolique, diastolique, et moyenne chez des animaux témoins (colonnes vides) et F50 (colonnes pleines) âgés de 6 mois. B et C: la glycémie mesurée au repos le matin (sans mise à jeun) (B) et la glycémie et l'insulinémie à jeun (C) présentées chez des animaux témoins (colonnes vides) et F50 (colonnes pleines) âgés de 8 mois. \*,  $p < 0,05$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$  témoins vs. FR50.

### III.D. Discussion

La persistance des altérations morphologiques et fonctionnelles au sein de la médullosurrénale ainsi que l'inversion du profil global d'expression génique de la glande observées chez le rat FR50 âgé de 8 mois traduit la programmation de troubles de l'homéostasie de la médullosurrénale, et plus globalement du système SSR, initiée par la dénutrition maternelle en période périnatale. Ainsi, nous sommes à présent en mesure de répondre par la négative à la question du caractère transitoire des altérations précoces de la mise en place et de la différenciation des cellules de la médullosurrénale. Les animaux FR50 représentent donc un modèle valide pour l'étude des adaptations du système SSR au cours d'une dénutrition périnatale et d'un RCIU, ainsi que de leurs potentielles implications dans la programmation de pathologies tardives.

#### III.D.1. Structure

Chez le rat, il est clairement établi que l'organisation structurale des CC, et notamment des îlots de CC NA, ainsi que de la médulla, est définitivement établie à P14, et qu'elle est retrouvée chez l'adulte (Grant *et al.*, 1994). Au regard de la persistance des altérations morphologiques des îlots de CC NA chez les animaux FR50 adultes, deux conclusions peuvent être tirées de ces données : premièrement, cette persistance corrobore les observations de Grant et collaborateurs quant à l'acquisition définitive de la structure de la médulla dès P14 ; et deuxièmement, l'établissement de cette architecture, et par là même la plasticité des CC, sont sensibles aux conditions nutritionnelles au cours de la période périnatale, et peuvent être soumises à des modifications développementales conservées après le sevrage.

Bien que la documentation des effets de l'environnement précoce sur la structure de la médullosurrénale et l'organisation des CC soit extrêmement limitée, une réduction du pourcentage de cellules TH et PNMT positives (A) a tout de même été notée au cours de la première semaine de vie postnatale chez des rats ayant subi une hypoxie prénatale (10 % O<sub>2</sub>) de long cours (E5 à E20) (Mamet *et al.*, 2002). Ces altérations sont cependant rétablies dès P21, et semblent vraisemblablement être dues à un défaut de croissance ou de différenciation des CC A et non à une organisation modifiée. Ainsi, bien que l'hypoxie puisse imposer une réduction du métabolisme énergétique, nos résultats indiquent que les effets de la restriction nutritionnelle sur la morphologie de la glande diffèrent, d'une part, par la restriction des altérations aux CC NA, et, d'autre part, par l'existence et la persistance à long terme de modifications de conformation

spatiale des CC. Des modifications de la taille de la médulla ont également été identifiées au cours des deux premières semaines de vie postnatale dans les modèles de surexposition prénatale, ponctuelle et chronique, du fœtus aux glucocorticoïdes (Manojlivic *et al.*, 1998c). De plus, cette réduction du volume de la médulla et du nombre de CC semble encore une fois être due à une réduction précoce (E20 à P5) de la prolifération des CC A et NA, ce qui rappelle les résultats obtenus à P21 (Molendi-Coste *et al.*, Horm Metab Res.). Un excès de glucocorticoïdes durant la période de gestation au cours de laquelle se forme la médullosurrénale (de E14 à P21) produit donc des effets inhibiteurs marqués sur la croissance des CC *in vivo*, bien que ceux-ci ne semblent pas intervenir de façon centrale dans leur prolifération, comme le montre l'étude des souris GR-/- (Finotto *et al.*, 1999).

### III.D.2. Innervation

Les résultats obtenus chez les animaux FR50 au cours de la période précoce montrent clairement une augmentation de l'innervation acétylcholinergique dès P14, ainsi qu'une désorganisation des fibres innervant la médullosurrénale au sevrage. Il apparaît que l'intensification de l'innervation préganglionnaire est conservée chez l'animal FR50 adulte, ce qui abonde globalement dans le sens de la programmation d'une hyperactivité du système SSR par la dénutrition maternelle périnatale.

De façon générale, ces résultats sont en accord avec un nombre croissant de données statuant sur la plasticité développementale du SNS suite à des modifications expérimentales de l'environnement précoce, telles que la température d'élevage, ou encore la manipulation des nouveau-nés (Young, 2002; chapitre I.C.3). De plus, notre étude corrobore les conclusions de Young ainsi que de Bertin et coll. (Bertin *et al.*, 1990b) quant à la fenêtre de sensibilité du SNS aux facteurs environnementaux au cours de la 2<sup>ème</sup> et de la 3<sup>ème</sup> semaine de vie postnatale. A notre connaissance, et bien que l'influence de la nutrition périnatale sur l'innervation sympathique de différents tissus, tels que le muscle cardiaque, le système nerveux entérique, le tissu adipeux, ou encore le pancréas, commence à être bien documentée (Gopalakrishnan *et al.*, 2004; Santer and Conboy, 1990; Young, 2002; Young and Morrison, 1998), nos résultats démontrent pour la première fois des modifications, à court et à long terme, de l'innervation sympathique des CC suite à une dénutrition maternelle périnatale. En considérant qu'une restriction protéique isocalorique durant la gestation et la lactation chez le rat induit non seulement une diminution du renouvellement de la NA au niveau de certains tissus (Young and Morrison, 1998), mais également des altérations du profil d'expression des récepteurs adrénergiques au niveau des

adipocytes (Petry *et al.*, 2000), il est tout à fait envisageable qu'un tel polymorphisme d'expression puisse découler du régime FR50 au niveau de différents tissus. Cette question, ainsi que celles de modifications de l'innervation sympathique d'autres organes, ou encore d'altérations des centres supérieurs du système SSR, resteront malheureusement en suspend.

Enfin, étant donné que la sécrétion des catécholamines est majoritairement contrôlée dans la médulla mature par l'innervation sympathique préganglionnaire des CC (établie dès P7), l'augmentation de son intensité chez les animaux FR50 adultes pourrait, de la même façon qu'au cours du développement postnatal tardif, participer à l'hyperactivité des CC en réponse au jeûne.

### III.D.3. Activité

Dans l'ensemble, nos résultats permettent de conclure à une hyperactivité des CC en réponse à un jeûne de 16 heures, qui représente un stress métabolique, chez les animaux FR50 adultes. L'analyse de l'ontogenèse de la glande médullosurrénale indique que son hyper-réponse à un stress métabolique (hypoglycémie hyperinsulinémique) est initiée en période postnatale précoce, ce qui corrobore les effets à long terme d'altérations dans le développement précoce du système SSR (Young, 2002). Dans ce sens, il a été récemment démontré que des épisodes hypoglycémiques antérieurs (J-2 et J-1) sont capables, à très court terme, d'altérer la réponse plasmatique et de réduire les contenus surrénaliens en A suite à une stimulation non-hypoglycémique ultérieure du SSR (J0) (Herlein *et al.*, 2006). De la même façon, la réponse SSR à l'hypoglycémie chronique induite par la restriction alimentaire précoce semble exercer des effets persistants sur la réponse de ce système à des stress intervenant à l'âge adulte, qu'ils soient métaboliques (figure 30) ou non (Lesage *et al.*, 2002a).

Cette augmentation de taux plasmatiques de catécholamines chez les animaux FR50 adultes s'effectue sans modification des contenus surrénaliens. En considérant que nos résultats préliminaires semblent indiquer que les contenus surrénaliens ne sont également pas modifiés au repos chez les animaux FR50 à 8 mois, ces données suggèrent 1) que la dénutrition maternelle périnatale ne semble pas induire d'altérations des capacités de stockage des CC, contrairement à ce qui est observé dans des modèles d'hypoxie prénatale (Mamet *et al.*, 2002) ou de dexaméthasone (Manojlivic *et al.*, 1998) ; et 2) que les capacités de réponse des CC à un stimuli, en terme de sécrétion (taux plasmatiques augmentés) et de synthèse (contenus surrénaliens non modifiés au repos et absence de déplétion en réponse au jeûne), sont accrues chez les animaux FR50 adultes.

En considérant que les glucocorticoïdes stimulent la synthèse des catécholamines sur des CC bovines et des phéochromocytomes humains en culture primaire, ainsi que sur des cellules PC12 (Morsink *et al.*, 2006; Yanase *et al.*, 1984), et participent au maintien d'un pool de granules sécrétables sous la membrane (Xu *et al.*, 2005), l'augmentation des taux de corticostérone libre, retrouvées chez le rat FR50 au cours de l'ontogenèse (Leonhardt *et al.*, 2002) ainsi qu'à 8 mois (Sebaai *et al.*, 2004), pourraient en partie expliquer l'accroissement suspecté des capacités de synthèse des CC à ces stades. De plus, le fait que des taux chroniquement élevés de glucocorticoïdes stimulent la réponse du système SSR au stress (Kvetnansky *et al.*, 1995) suggère qu'un tel effet puisse être à l'origine de la réponse exagérée des taux de catécholamines plasmatiques en réponse au jeûne chez les animaux FR50. A l'inverse, les catécholamines stimulent la production de glucocorticoïdes par le cortex surrénalien de façon indépendante de l'ACTH (Bornstein and Vaudry, 1998; Vaudry *et al.*, 2000b). Comme nous l'avons déjà noté, les rats FR50 âgés de 8 mois présentent une hyperactivité basale de l'axe corticotrope (Sebaai *et al.*, 2004), et ce malgré une ACTHémie normale. Il a été soulevé qu'un tel découplage entre le contrôle central et l'activité terminale de l'axe HHS, et notamment en cas de stress chronique ou aigu, puisse découler des régulations différentielles du contrôle du cortex surrénalien faisant intervenir, entre autres, la médullosurrénale ainsi que les afférences nerveuses (Bornstein and Vaudry, 1998). Ainsi, les modifications de l'activité des CC décrites ici chez les animaux FR50, au cours du développement et du vieillissement, pourraient participer au dysfonctionnement concomitant des cellules corticales.

Bien que l'hyperactivité des CC soit associée à des modifications de la machinerie de sécrétion A, les altérations des granules NA ainsi que la surexpression du GAP-43 ne sont plus retrouvées à l'âge adulte. Il est reconnu que les molécules impliquées dans le processus de sécrétion peuvent elles-mêmes être affectées par une régulation différentielle entre les CC A et NA. L'expression des SNAREs et autres protéines impliquées dans la neurotransmission peut fortement influencer les fonctions de la glande surrénale, et jouerait donc un rôle dans la modulation différentielle des processus de sécrétion entre les deux phénotypes de CC (Langley and Grant, 1999). Dans ce sens, les mêmes auteurs avaient précédemment suggéré que l'affinité de telles molécules pour divers seconds messagers, dont le  $Ca^{2+}$ , pourrait être spécifique à leurs différentes isoformes (Langley and Grant, 1995; Langley and Grant, 1997). Ils en conclurent donc qu'il est envisageable que la régulation des processus de sécrétion puisse varier d'un phénotype SSR à l'autre, et ce, bien que ceux-ci partagent l'expression de certains facteurs participant à la

voie régulée d'exocytose. En ce qui concerne les CC, l'expression différentielle de molécules telles que le GAP-43 ou les SNAREs pourrait partiellement expliquer les différences dans les mécanismes de sécrétion entre les CC A et NA (Langley and Grant, 1995). De la même façon, de telles variations dans la distribution des canaux calciques (Lomax *et al.*, 1997), des R-ACh et autres sécrétagogues (Michelena *et al.*, 1991) ainsi que des protéines de liaison au Ca<sup>2+</sup>, telle que la sous-unité p11 de l'annexine II (Nelson and Creutz, 1995) entre les deux populations de CC sont autant d'autres voies possibles de régulation différentielle de leur activité sécrétrice.

Quoi qu'il en soit, la régulation de la libération des catécholamines semble majoritairement intervenir au niveau de différents acteurs de l'acheminement des granules chromaffines vers la membrane, dont le réseau d'actine sous-membranaire (en limitant l'accès des granules à leur site d'exocytose), les protéines de liaison du GTP (qui contrôlent les interactions entre le cytosquelette et la membrane des granules), et l'annexine (qui semble effectuer la liaison avec les phospholipides membranaires) (Aunis and Langley, 1999). Ainsi, et indépendamment de toute modification des granules de sécrétion, il est fortement probable que de tels mécanismes soient altérés chez les animaux FR50. Dans ce sens, l'expression précoce et tardive d'un certain nombre de protéines du cytosquelette impliquées dans le trafic des granules est modifiée chez les animaux FR50 (tableaux 4 et 5). Enfin, le profil global de sous expression programmé chez l'adulte par le régime FR50 ainsi que la surexpression, au sevrage, et la sous-expression, à 8 mois, du messenger codant la Dnmt-3A suggèrent fortement l'implication de modifications épigénétiques dans les adaptations du système SSR suscitées par la dénutrition maternelle périnatale.

A notre connaissance, nos résultats démontrent pour la première fois la persistance à l'âge adulte de perturbations de l'activité de la glande médullosurrénale, et de son innervation préganglionnaire, établies au cours de la période postnatale précoce dans un modèle de dénutrition maternelle périnatale. L'existence de telles perturbations du système SSR chez les animaux FR50, et qui semblent globalement traduire une hyperactivité, est un argument supplémentaire majeur en faveur d'une sensibilité du système SSR aux conditions environnementales rencontrées au cours de périodes critiques de son développement, et à la nutrition périnatale, bien que les données à ce sujet restent limitées. De façon très intéressante, et comme nous l'avons déjà noté (chapitre I.B.3.1), des études épidémiologiques récentes font également état d'altérations précoces et tardives de l'activité du système SSR suite à un RCIU (Phillips, 2007; Phillips and Jones, 2006). Ainsi, en considérant les fonctions vitales des catécholamines dans la régulation du métabolisme

énergétique et cardiovasculaire (Chapitre I.C.4.), de telles modifications de l'activité du système SSR, notamment en réponse au stress, pourraient alors participer, une fois l'organisme vieillissant, à l'étiologie des pathologies associées au syndrome métabolique et programmées par l'environnement précoce (Barker *et al.*, 1993c; Phillips *et al.*, 2006; Young, 2002; Young, 2006; Young and Morrison, 1998).

**IV DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES : IMPLICATIONS  
POTENTIELLES DU SYSTÈME SYMPATHOSURRENALIEN DANS LA  
PROGRAMMATION DE PATHOLOGIES**

#### IV.A. Hypertension artérielle

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence chez les animaux FR50 une hypertension systolique à l'âge de 6 mois (+14 mm Hg), qui s'accompagne d'une augmentation de l'AVP chez l'adulte dès 4 mois (Sebaai *et al.*, 2002a), et qui persiste à 8 mois (données non publiées). Compte tenu des rôles fondamentaux des catécholamines dans la régulation de l'activité des différents acteurs impliqués dans le maintien de la pression artérielle (paragraphe I.C.4.2.), les modifications du système SSR rapportées ici pourraient participer à la programmation de cette hypertension. En effet, le système SSR pourrait vraisemblablement être impliqué dans la genèse de pathologies cardiovasculaires. Chez les individus sains, des études de suivi ont pu démontrer l'influence néfaste à long terme des réponses à des stressseurs qui activent préférentiellement le système SSR, et établir une relation avec la pression sanguine (Treiber *et al.*, 1996) et le développement d'une hypertension (Menkes *et al.*, 1989). De tels stress sont également associés à une athérosclérose carotidienne (Everson *et al.*, 1997) ainsi qu'à un accroissement de la masse du ventricule gauche (Allen *et al.*, 1997; Kamarck *et al.*, 2000). Parallèlement, d'autres données obtenues chez des individus sains semblent indiquer que la sensibilité accrue des femmes aux effets délétères du vieillissement sur l'augmentation de la pression artérielle est accompagnée d'une intensification plus importante du rythme des décharges sympathiques avec l'âge, comparé aux hommes (Narkiewicz *et al.*, 2005). Les auteurs en concluent que l'activité du système sympathique doit contribuer de façon importante à l'influence plus marquée de l'âge sur la pression sanguine et les maladies cardiovasculaires chez la femme. Ainsi, des activations non pathologiques du système SSR suffisent à induire des altérations délétères du métabolisme cardiovasculaire.

Une augmentation de l'activité endocrine du système SSR représente une des causes reconnues de l'apparition d'une hypertension chez l'homme. Un exemple frappant est le développement fréquent d'une hypertension par les patients présentant une tumeur des CC hyper-sécrétrice de catécholamines, ou phéochromocytome (Maiter, 2004). Il a par ailleurs été démontré que le système SSR joue un rôle central dans la pathogenèse, les séquelles, ainsi que la thérapie de l'hypertension essentielle (DeQuattro *et al.*, 1988; DeQuattro and Feng, 2002). Certaines données cliniques récentes indiquent que l'hyperactivité du système SSR provoquée par les syndromes d'apnée du sommeil (Chwan Ng *et al.*, 2007) et de stress post traumatique (Bedi and Arora, 2007) serait également à l'origine des troubles cardiovasculaires associés à ces pathologies. Quoi qu'il

en soit, il semblerait qu'à court terme, les catécholamines influencent uniquement la composante cardiovasculaire de la régulation de la pression artérielle, et n'exercent pas d'effets pro-hypertensifs marqués sur la fonction rénale (Boesen *et al.*, 2007). Des données plus récentes abondent dans ce sens, en démontrant que la suppression des effets catécholaminergiques sur le tonus vasculaire chez une partie des patients atteints d'hypertension, et qui ne répondent pas aux vasodilatateurs, peut constituer une des voies thérapeutiques envisageables pour normaliser la pression artérielle (Hirsch, 2007). Parallèlement et comme nous l'avons déjà noté, une naissance prématurée ainsi qu'un défaut de croissance fœtale sont associées à un accroissement de l'activité du système SSR dans l'enfance, comme en témoigne l'augmentation du rythme cardiaque et des catécholamines urinaires (Johansson *et al.*, 2007). De plus, chez les enfants obèses, la sévérité de l'obésité ainsi que de l'activation du système SSR semblent être les deux principaux facteurs impliqués dans l'augmentation de la pression artérielle (Gilardini *et al.*, 2007). Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que le contrôle cardiovasculaire, notamment exercé par le système SSR, est différemment programmé par un environnement précoce défavorable, avec une augmentation possible des risques de développer une hypertension à l'âge adulte. De plus, le modèle FR50 pourrait représenter un terrain expérimental adéquat pour l'analyse des effets d'agents thérapeutiques anti-hypertensifs dirigés contre le système SSR, ainsi que des mécanismes qu'ils mobilisent.

Il semblerait que les interactions existant entre le système rénine-angiotensine, et plus globalement la composante endocrine du rein, et les catécholamines, puissent également participer aux effets délétères d'une modification de l'activité du système SSR sur la régulation de la pression artérielle. En effet, chez l'homme, il a été observé une meilleure réduction du rythme cardiaque ainsi que de la résistance vasculaire suite à l'administration d'un antagoniste  $\beta$ -adrénergique chez les patients hypertendus qui présentent des taux élevés de rénine (Esler *et al.*, 1976). De plus, ces mêmes auteurs ont montré, non seulement une relation positive entre les taux de rénine et de NA chez des patients jeunes atteints d'hypertension, mais également une réduction plus importante de la pression artérielle chez les patients présentant les plus hauts taux de rénine suite à une inhibition du système autonome (Esler *et al.*, 1977). Ainsi, le rôle des catécholamines dans l'élévation de la pression artérielle pourrait également s'exercer via leurs interactions avec le système rénine-angiotensine. Des études très récentes ont également montré que certains facteurs sécrétés par le rein pourraient être impliqués dans la régulation des voies catécholaminergiques. Par exemple, l'administration de rénalase, une amine-oxydase qui métabolise les catécholamines

et qui est sécrétée majoritairement par le rein, mais également par le cœur, le muscle squelettique, et l'intestin grêle, réduit la pression artérielle ainsi que le rythme et la contractilité cardiaques chez l'humain, tout en inhibant l'augmentation compensatoire du tonus vasculaire périphérique (Xu *et al.*, 2005). Chez le rat, l'injection d'ARN anti-sens de la rénalase augmente la pression basale et potentialise la réponse de la pression artérielle à un stress adrénérgique. La rénalase, via son influence sur le métabolisme des catécholamines, pourrait donc participer à la régulation de la fonction cardiaque et de la pression artérielle (Xu and Desir, 2007), et constituer un maillon de plus dans la chaîne des interactions qui lie le rein et le système SSR. Cependant, bien que l'existence de la rénalase et de telles interactions ne soient plus à démontrer, l'influence physiologique de cette enzyme sur les catécholamines circulantes reste à clarifier (Boomsma and Tipton, 2007). Ainsi, compte tenu de l'augmentation concomitante de la pression artérielle et de l'activité du système SSR à l'âge adulte, il est tout a fait probable que des modifications de la fonction endocrine du rein, et notamment du système rénine-angiotensine, puissent également être induites par la dénutrition maternelle, de façon dépendante ou indépendante du système SSR. Ces modifications participeraient ainsi à l'augmentation de la pression artérielle observée chez les animaux FR50. Dans ce sens, des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré qu'une restriction calorique de 70% au cours de la gestation programme le développement d'une hypertension artérielle chez la descendance mâle âgée de 4 mois, et que cette dernière est vraisemblablement liée à des modifications du système rénine-angiotensine, et notamment des enzymes de conversion de l'angiotensine (Riviere *et al.*, 2005). De la même façon, une brève exposition à la dexaméthasone à la fin du premier mois de gestation chez le mouton induit, en fin de gestation, des altérations de l'expression de différents effecteurs du système rénine-angiotensine au niveau des centres sympathiques moteurs supra-spinaux, dont certaines sont toujours présentes à l'âge de 7 ans (Dodic *et al.*, 2002a; Dodic *et al.*, 2002b).

Enfin, il a été démontré qu'une injection chronique de leptine entre P0 et P10 chez le rat induit une augmentation des contenus surrénaliens en catécholamines à 5 mois, ainsi qu'une augmentation simultanée de la pression systolique et du rythme cardiaque (Trevenzoli *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent que la leptinémie, qui reflète en partie le statut nutritionnel de l'organisme, influence le fonctionnement de la glande médullosurrénale au cours de la vie précoce, ce qui pourrait exercer une influence à long terme et contribuer aux altérations des paramètres cardiovasculaires retrouvés dans les modèles de programmation nutritionnelle (Young,

2006). Bien que la leptinémie soit au contraire réduite chez les rats FR50 au cours de la période postnatale précoce, les contenus surrénaliens ne sont pas modifiés chez l'adulte.

Dans l'ensemble, ces données, ainsi que celles rapportées au cours de cette thèse, abondent dans le sens de l'influence pernicieuse des adaptations précoces du système SSR, et notamment en réponse aux modifications de l'homéostasie énergétique induites par un environnement nutritionnel périnatal défavorable, sur la régulation adéquate de la pression artérielle chez l'adulte.

#### IV.B. Altérations du métabolisme énergétique

Au cours de notre étude, nous avons pu mettre en évidence que les animaux FR50 âgés de 8 mois présentent une glycémie normale à jeun, tandis que l'insulinémie est réduite, ce qui était déjà trouvé à 4 mois (Léonhardt, 2003). Parallèlement, ces mêmes animaux apparaissent hyperglycémiques lorsque les prélèvements sont effectués au cours de la matinée sans mise à jeun, ce qui peut correspondre : 1) à une inefficacité de l'action de l'insuline en période postprandiale, probablement liée à un défaut de sécrétion de cette dernière comme le laisse présumer l'insulinémie à 16 heures de jeûne ; 2) à un décalage de phase dans le cycle d'alimentation des animaux FR50. Bien que la réduction de la masse du tissu adipeux blanc périrénal suite la dénutrition périnatale semble présumer de troubles du métabolisme lipidique, des études plus poussées des acteurs impliqués dans sa régulation ainsi que de la composition corporelle, par tomographie par exemple, sont nécessaires afin d'apporter une réponse sans équivoque.

Au sevrage, la réduction de la masse du tissu adipeux suite au régime FR50 (Léonhardt *et al.*, 2003), manifestement liée à la réduction de l'apport nutritionnel par le lait maternel, est accompagnée d'une diminution parallèle des taux de leptine, qui sont, comme pour l'insuline, étroitement corrélés à la masse du tissu adipeux (Ostlund, Jr. *et al.*, 1996; Schwartz, 2001). A l'inverse, chez les animaux FR50 adultes âgés de 4 mois, la réduction de la masse du TA, bien que toujours présente, n'est plus corrélée à une diminution des taux circulants de leptine ni d'insuline (Léonhardt, 2003). Ces résultats démontrent l'existence d'altérations du développement du TA et du contrôle de la sécrétion de la leptine à long terme chez les animaux FR50. Bien que nous n'ayons évalué les taux de leptine plasmatique à 8 mois, la persistance de la réduction de la masse du TA blanc semble indiquer la pérennité des altérations du contrôle des adipocytes. En considérant que la sécrétion de leptine est fortement stimulée par les glucocorticoïdes, notamment chez l'homme (Gogo-Jack *et al.*, 1997; Halleux *et al.*, 1998), le maintien des taux de leptine malgré la réduction de la masse du tissu adipeux chez les animaux FR50 adultes âgés de 4 mois pourrait découler des taux chroniquement élevés de glucocorticoïdes libre chez ces animaux (Sebaai *et al.*, 2004). Parallèlement, Young (Young *et al.*, 2002) a rapporté, chez des animaux élevés à 18°C, une abolition de l'augmentation de l'excrétion d'A en réponse au jeûne chez les adultes jeunes, ce qu'il suggère pouvoir être impliqué dans l'obésité développée par ces animaux. Ainsi, l'accentuation de la réponse de la médulla à l'hypoglycémie chez les animaux FR50

pourrait participer à expliquer la persistance de la réduction de la masse du tissu adipeux à l'âge adulte.

Globalement, les modifications des catécholamines circulantes et de l'insulinémie en réponse au jeûne, de la glycémie postprandiale, et de la masse du tissu adipeux périrénal, montrent que les animaux FR50 présentent manifestement des troubles du métabolisme énergétique, comprenant des troubles de l'insulinémie. De façon similaire, un régime à 8% de protéines au cours de la lactation chez le rat induit, à 180 jours, une réduction de la glycémie et de la masse graisseuse viscérale, vraisemblablement liées à une augmentation des contenus surrénaliens en catécholamines ou à l'hypoinsulinémie présentée par ces animaux (Fagundes *et al.*, 2007). Au regard de nos résultats, ces observations suggèrent que les catécholamines semblent pouvoir être impliquées dans la genèse des troubles du métabolisme, à la fois glucidique et lipidique, développés suite à des modifications des conditions nutritionnelles précoces.

#### IV.B.1. Métabolisme glucidique

Julius et Gudbrandsson émirent les premiers l'hypothèse selon laquelle des taux élevés de catécholamines, de par leur effets hypertenseurs et hémodynamiques, sont capables d'induire directement une résistance à l'insuline (Julius and Gudbrandsson, 1992). Par la suite, les effets bénéfiques d'une surrénalectomie sur la réduction de la tolérance au glucose développée par des souris rendues obèses suite à une injection d'auro-thiogluose, indiquèrent également une implication des catécholamines dans la genèse d'une intolérance au glucose (Blair *et al.*, 1994).

Les animaux FR50 âgés de quatre mois présentent déjà des troubles du métabolisme glucidique (Léonhardt, 2003). En effet, des travaux effectués au laboratoire ont permis de mettre en évidence, d'une part, une hausse de l'insulinémie en période postprandiale sans augmentation de la glycémie, et, d'autre part, une réduction de l'insulinémie à jeun chez les animaux dénutris. Bien que l'insulinémie en réponse au jeûne n'ait pas été mesurée chez les animaux FR50 âgés de 8 mois, la conservation des altérations des concentrations plasmatiques de glucose et d'insuline dans de telles conditions, ainsi que l'augmentation de la glycémie postprandiale, indiquent que la dénutrition maternelle périnatale programme l'apparition, à moyen et à long terme, d'une capacité limitée à sécréter de l'insuline. De telles altérations pourraient vraisemblablement concourir à l'établissement d'un diabète de type II comme il a précédemment été décrit chez le rat (Phillips and Barker, 1997; Simmons *et al.*, 2001). De façon saisissante, un certain nombre de données expérimentales semblent indiquer que l'hyperinsulinémie *per se* peut accroître l'activité du SNS

(Hausberg *et al.*, 1997), ce qui pourrait former une boucle d'auto-amplification de la résistance à l'insuline. Il est également important de noter que les femelles FR50 âgées de 4 mois ne présentent pas de résistance à l'insuline. Au regard des changements de la tolérance au glucose observés suite à une dénutrition protéique précoce (Ozanne and Hales, 2002), il apparaît que de telles modifications sont fonction non seulement du sexe, mais également de l'âge des animaux dans un modèle donné.

Quoi qu'il en soit, la programmation d'une intolérance au glucose et d'une résistance à l'insuline pourrait être liée, en accord avec la théorie du « thrifty phenotype », à des mécanismes mis en place précocement et visant à économiser le glucose périphérique (Hales and Barker, 1992; Hales and Barker, 2001). En considérant que les altérations du métabolisme glucidique sont accompagnées d'un accroissement de l'activité du système SSR en réponse à un stress (métabolique ou à l'éther/contention à 4 mois) tout au long du développement et du vieillissement chez les animaux FR50, des adaptations de l'activité du système SSR pourraient figurer parmi ces mécanismes.

#### IV.B.2. Métabolisme lipidique

Compte tenu des fonctions exercées par les catécholamines dans le contrôle de l'activité lipolytique des adipocytes (Arner, 2005; Holm *et al.*, 2000; Londos *et al.*, 1996; Tansey *et al.*, 2004), la genèse de troubles du métabolisme lipidique semble également pouvoir découler d'altérations du système SSR, et ce à plusieurs niveaux.

D'une part, les catécholamines pourraient agir directement sur le métabolisme des adipocytes. Il a été suggéré qu'une réduction de l'activation du système SSR, qui mène à une réduction de la thermogenèse, puisse sous-tendre le développement de l'obésité (Bray *et al.*, 1989; Peterson *et al.*, 1988). Cependant, un certain nombre d'études plus récentes vont à l'encontre de cette théorie, et démontrent au contraire une augmentation de l'innervation NA du muscle squelettique, des vaisseaux sanguins, ou encore du rein chez les individus obèses (Esler *et al.*, 2003). En considérant qu'il a été démontré qu'une exposition prolongée à un agoniste  $\beta$ -adrénergique entraîne une désensibilisation des R $\beta$ 3 adipocytaires (Ferrand *et al.*, 2006), une hyperactivité chronique du système SSR pourrait également mener à une réduction de la stimulation de la lipolyse par les catécholamines, et ainsi participer à la genèse d'une obésité. De la même façon, l'administration chronique d'éthanol supprime la réponse des adipocytes à une activation des récepteurs  $\beta$  (Kang and Nagy, 2006), ce qui pourrait être, entre autre, à l'origine de

l'obésité fréquemment développée par les personnes atteintes d'alcoolisme chronique. De façon parallèle et quelque peu contradictoire, Fu et coll. (Fu *et al.*, 2007) ont pu mettre en évidence que la résistance à l'insuline induite par les catécholamines dans les adipocytes est dépendante de l'augmentation du TNF $\alpha$  et de la diminution de l'adiponectine, provoquées par l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Il faut néanmoins considérer que le système SSR est composé, d'une part, du SNS, dont l'activité semble localement augmentée chez les sujets obèses (Eikelis and Esler, 2005), et, d'autre part, par la médullosurrénale, qui semble plutôt présenter une hypoactivité dans l'obésité (Del Rio G., 2000). Par ailleurs, les catécholamines semblent également exercer une influence sur l'expression de molécules impliquées dans la régulation auto/paracrine du métabolisme adipocytaire. Par exemple, l'administration d'isoprotérénol (agoniste des récepteurs  $\beta$ ) stimule la production de la protéine TIMP-I (tissue inhibitor of metalloproteinase), qui est surexprimée dans l'obésité, et dont le rôle pourrait être de promouvoir le développement du TA (Kralisch *et al.*, 2006b). Le système SSR pourrait donc stimuler indirectement la croissance du tissu adipeux, et par la même participer, si ce n'est au développement, au maintien de l'obésité. L'isoprotérénol stimule également la transcription et la sécrétion par les adipocytes 2T2-L1 d'une autre protéine surexprimée dans l'obésité, la MCP-I (monocyte chemoattractant protein) (Kralisch *et al.*, 2006a). En considérant que la MCP-I semble induire une insulino-résistance, en altérant notamment la signalisation de l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux *in vitro*, elle représente un candidat qui pourrait potentiellement relier obésité, résistance à l'insuline, et catécholamines. De plus, la MCP-I exerce également une influence proinflammatoire (Kanda *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006) et pourrait représenter un des acteurs du lien qui semble exister entre obésité et inflammation (Clement and Langin, 2007). Ainsi, il apparaît qu'un déséquilibre de la signalisation catécholaminergique au niveau du tissu adipeux, qu'elle soit directe ou indirecte via la stimulation d'autres molécules, pourrait participer au développement d'une obésité ou/et d'un diabète de type II. Enfin, outre les catécholamines, d'autres facteurs produits par la médulla semblent capables d'influencer l'activité des adipocytes, comme l'adrénomédulline, qui stimule la lipolyse et augmente l'expression de l'UCP-1 dans le tissu adipeux brun (Go *et al.*, 2007).

D'autre part, des modifications de l'activité du système SSR pourraient exercer des effets pathogènes en interagissant avec le principal médiateur du tissu adipeux, qui intervient de façon centrale dans l'inhibition de la prise alimentaire : la leptine. En effet, et sans y revenir, un nombre croissant d'études indique que la leptine est directement impliquée dans les mécanismes de programmation (Cottrell and Ozanne, 2007). Etant donné que les catécholamines inhibent la

transcription et la sécrétion de leptine chez les individus obèses, et compte tenu des effets stimulateurs de l'insuline sur la sécrétion de leptine (Cammisotto *et al.*, 2006), elles pourraient influencer le dialogue existant entre les stocks énergétiques et la régulation centrale de la prise alimentaire. A l'inverse, la leptine active la sécrétion des catécholamines par la médullosurrénale (Malendowicz *et al.*, 2007) ainsi que les centres hypothalamiques stimulateurs des centres régulateurs sympathiques (Trayhurn *et al.*, 1998), ce qui permettrait un accroissement des dépenses énergétiques et sous-tendrait les effets lipolytiques de cette hormone chez le rongeur (Mark *et al.*, 2003; van Dijk, 2001). Les interactions entre la leptine et le système sympathique pourraient alors constituer une boucle de rétrocontrôle à la fois de la prise alimentaire, via l'inhibition centrale exercée par la leptine sur cette dernière, et plus globalement du métabolisme énergétique, via l'activation des centres moteurs sympathiques. Cette boucle leptine-système SSR-leptine participerait ainsi au contrôle de l'activité et de la masse du tissu adipeux, mais également à la régulation de la pression artérielle, via la modulation des effets des catécholamines sur cette dernière (Mark *et al.*, 2003). Cependant, chez l'homme, bien que la leptine semble également stimuler l'innervation sympathique du rein, l'étude de patients présentant une hypoactivité - mutation autosomique, hyposécrétion clinique d'A - ou hyperactivité - hypertension essentielle<sup>37</sup>, malaises cardiaques, tonus sympathique élevé - du système SSR a révélé des taux normaux de leptine, ce qui va à l'encontre de l'existence de cette boucle chez l'homme (Eikelis *et al.*, 2003; Eikelis *et al.*, 2004; Eikelis and Esler, 2005). Cependant, comme il s'agit là de conditions chroniques de modulation de l'activité sympathique, qui plus est pathologiques, l'existence de mécanismes compensatoires de cette boucle n'est pas à exclure, et l'étude des effets d'une infusion directe de ces différents acteurs manque cruellement à la compréhension de leurs interactions en conditions non pathologiques chez l'homme. Enfin, en considérant 1) que la leptine inhibe à la fois la sécrétion de CRH par l'hypothalamus, d'ACTH par l'hypophyse, et celle des stéroïdes par le cortex (notamment stimulée par l'ACTH) sur des cellules humaines en culture ; 2) qu'elle atténue la réponse du cortex à différents stress (Glasow and Bornstein, 2000; Malendowicz *et al.*, 2007) ; 3) que les glucocorticoïdes, administrés au long terme (2 jours) stimulent la transcription et la libération de leptine par des adipocytes humains en culture (Lee *et al.*, 2007) ; 4) que les glucocorticoïdes exercent des effets inhibiteurs sur l'action de la leptine, ce

---

<sup>37</sup> 95 % des hypertensions artérielles n'ont pas de cause retrouvée. On parle alors d'hypertension artérielle essentielle

qui pourrait participer à l'établissement d'une résistance à la leptine (Sliker *et al.*, 1996) ; et 5) que les patients atteints d'obésité présentent fréquemment une hyperactivité de l'axe HHS (Pasquali *et al.*, 2006) ; l'axe HHS semble donc également jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la leptinémie ainsi que dans les variations de cette dernière chez les individus obèses. L'ensemble de ces observations permet donc de conclure à l'existence de relations étroites entre la régulation du métabolisme énergétique (leptine et insuline) et du stress (systèmes SSR et HHS), notamment chez les individus obèses (Malendowicz *et al.*, 2007; Mark *et al.*, 200a). La compréhension de l'équilibre physiologique qui en résulte, ainsi que des conséquences découlant de l'altération de cet équilibre, sont cependant loin d'être complètes (Cottrell and Ozanne, 2007).

Bien que les animaux FR50 ne présentent pas d'obésité à l'âge adulte, ces quatre facteurs (insuline, leptine, et systèmes SSR et HHS) sont altérés, ce qui témoigne de profondes perturbations des axes de contrôle du métabolisme énergétique et du stress suite à une dénutrition maternelle périnatale. Le régime FR50 fournit donc un modèle physiologique pour l'étude des mécanismes compensatoires issus des interactions entre ces différents acteurs, et qui, visant à rétablir une homéostasie énergétique optimale dans des conditions développementales défavorables, réinitialiseraient le niveau d'activité des différents axes neuroendocriniens, et aboutiraient ainsi à une « mésadaptation », ou allostasie délétère, sur le long terme (Cottrell and Ozanne, 2007c; Phillips, 2007i; Young, 2002a), paragraphe I.A.1.2.).

#### **IV.C. Effets de la dénutrition périnatale au niveau central**

La réduction de la prolifération des CC, qui, rappelons le, proviennent de cellules précurseurs issues de la crête neurale, à la fin du stress nutritionnel suggère que de telles altérations de la prolifération puissent exister au niveau central chez les animaux dénutris au cours de la période postnatale. Chez le rat, la courbe de vélocité de la croissance du cerveau, présentée paragraphe I.B.1.1. (figure 6), montre que celle-ci connaît une accélération de la dernière semaine de gestation à la dernière semaine de lactation, ce qui explique que le cerveau en développement soit relativement insensible à une dénutrition appliquée au début de la gestation (Dobbing, 1974; Dobbing and Sands, 1971). A l'inverse, une dénutrition qui s'applique plus tardivement au cours de l'ontogenèse (E14 à P21) entraîne une diminution permanente du nombre total de cellules dans le cerveau, comme le montre la diminution du contenu total en ADN (Dobbing and Smart, 1974). Cette diminution semble de plus être vraisemblablement liée à une réduction de la neurogenèse (Lewis *et al.*, 1979). Toujours dans ce sens, des études ont montré qu'une sous-nutrition de P0 à P30 chez le rat entraîne une réduction du nombre de neurones granulaires dans le gyrus denté de l'hippocampe à l'âge adulte, réduction qui pourrait d'ailleurs être liée à la diminution de la durée du cycle cellulaire induite par la restriction alimentaire (Bedi, 2003). Dans l'ensemble, la neurogenèse au niveau de l'hippocampe semble être particulièrement affectée par la sous-nutrition, car la baisse du nombre de neurones est principalement localisée dans cette structure (Debassio *et al.*, 1994). Dans ce contexte, des travaux basés sur des marquages au BrDU ont été entrepris au laboratoire et ont effectivement pu mettre en évidence une réduction de la prolifération des neurones hippocampiques, mais également des neurones hypothalamiques (Coupe *et al.* 2007, manuscrit soumis à Eur. J Neurosci.) en période postnatale. La neurogenèse dépend de l'influence de nombreuses neurotrophines dont le NGF, le BDNF et la NT-3, qui de plus semblent être des cibles possibles dans certains modèles de programmation (Ernfors *et al.*, 1992; Sugiyama *et al.*, 2003). Ainsi, la diminution de la neurogenèse dans l'hippocampe des rats dénutris précocement laisse plutôt supposer une diminution de ces facteurs de croissance (Bedi, 2003a). De façon surprenante, la poursuite des travaux de notre laboratoire a au contraire mis en évidence une réduction du BDNF central chez les animaux FR50 en période postnatale (Coupe *et al.* 2007), ce qui confirme cependant l'influence de la dénutrition périnatale sur les facteurs de croissance au niveau central dans notre modèle.

La survie des neurones dépend majoritairement de leur migration vers leur emplacement définitif, ainsi que de la génération des extensions dendritiques et axonales et de l'établissement de contacts adéquats avec les neurones voisins ainsi qu'avec leurs cellules cibles (Blue and Parnavelas, 1983a; Blue and Parnavelas, 1983b). Il est intéressant de noter qu'une dénutrition au cours du développement du cerveau induit des altérations neuroanatomiques. En effet, un retard de la migration neuronale des cellules granulaires du bulbe olfactif (Debassio and Kemper, 1985), une réduction de l'arborisation dendritique au niveau du néocortex (Cordero *et al.*, 1986) ainsi que, plus globalement, une perturbation des processus de synaptogenèse (Diaz-Cintra *et al.*, 1981) ont été observés suite à une dénutrition. En considérant 1) que les processus de plasticité des CC sont altérés chez les animaux FR50 en période postnatale, ce qui, rappelons le, correspond à la fin de la période de croissance rapide du cerveau ; 2) que ces processus sont partiellement sous-tendus par l'expression de protéines du cytosquelette impliquées dans la motilité et la croissance axonale ; 3) que certaines de ces protéines sont surexprimées dans la médulla des animaux FR50 au sevrage, telles que le GAP-43 et le Neurofilament 3; et 4) que l'expression ainsi que les fonctions de ces deux protagonistes sont conservés au sein des neurones (Caroni, 2001; Sihag *et al.*, 2007) ; il semble envisageable que des altérations du même ordre puissent être retrouvées au niveau de différentes populations neuronales des centres moteurs sympathiques, et plus globalement du SNC. De ce fait, la sous-nutrition pourrait également être responsable, de façon indirecte, d'un accroissement de la mort neuronale via la perturbation de la migration et/ou de la synaptogenèse. Cette hypothèse d'une apoptose centrale accrue est d'autant plus probante que les processus apoptotiques semblent accentués dans les cellules de la médulla.

Bien qu'un retour à une alimentation *ad libitum* corrige la plupart des effets cités ci-dessus, les altérations des processus de différenciation cellulaire pouvant mener à l'établissement de connections synaptiques inappropriées, pourraient conduire, à long terme, à des déficits fonctionnels du cerveau d'origine neurodéveloppementale (Galler *et al.*, 1997). L'hippocampe, qui apparaît comme une région particulièrement sensible aux effets de la sous-nutrition précoce, présente ainsi des altérations neurofonctionnelles, dont certaines persistent à l'âge adulte, et ce malgré un retour à une alimentation « normale » (Morgane *et al.*, 1993). Par exemple, les modifications de la plasticité de l'hippocampe sont associées à des changements persistants dans des mécanismes de neurotransmission tels que la potentialisation à long terme ou LTP (Austin *et al.*, 1986; Jordan and Clark, 1983). Ainsi, en considérant que l'hippocampe est fortement impliqué dans les processus mnésiques, notamment dans la mémoire spatiale (Morris 1982), il

n'est pas surprenant que la dénutrition maternelle précoce exerce des effets à long terme sur les performances d'apprentissage spatial (Bedi, 1992; Campbell and Bedi, 1989). Il a par ailleurs été suggéré que de telles altérations du développement du cerveau par une sous-nutrition précoce puissent être à l'origine de désordres affectifs ou anxieux (Heim and Nemeroff, 1999). Dans ce sens, des perturbations des systèmes de neurotransmetteurs potentiellement impliqués dans de tels désordres, tels que la sérotonine (Blatt *et al.*, 1994), le GABA (Wiggins *et al.*, 1984), mais aussi les catécholamines (Seidler *et al.*, 1990), ont également été mises en évidence suite à une dénutrition précoce. Enfin, il apparaît que d'autres pathologies liées à des désordres de ces systèmes de neurotransmetteurs, telles que la dépression ou encore certaines formes de schizophrénie, pourraient être la conséquence d'altérations subies pendant la période périnatale (Clarke *et al.*, 2006; Kajantie, 2006).

Outre ses conséquences métaboliques, une hyper-activation du système SSR pourrait également participer à ces troubles en exerçant une influence néfaste sur les processus émotionnels et cognitifs, tels que l'humeur et l'anxiété (Heim and Nemeroff, 1999), ou l'agressivité et l'hostilité (Lee 1987). A l'inverse, le contrôle de ces processus chez des patients hypertendus, via la pratique quotidienne de la relaxation, permet de réduire de façon durable la pression artérielle, ainsi que l'hypertrophie du ventricule gauche qui y est associée (De Quattro *et al.*, 1986; Heim and Nemeroff, 1999; Wadden, 1983). Ainsi, et de façon tout à fait dérangeante pour l'industrie pharmaceutique, ces techniques apparentées à la « rétroaction biologique » (paragraphe I.C.1.3.) pourraient représenter un axe thérapeutique efficace (mais gratuit...) pour le traitement des effets du stress (glucocorticoïdes et catécholamines) sur le développement et l'aggravation de pathologies telles que l'hypertension ou le diabète de type II. A ce titre, de nombreux hôpitaux en France proposent des séances de sophrologie aux patients atteints de ces pathologies, mais également, et de façon tout à fait concluante, aux femmes enceintes. Cependant, et contrairement aux contrées asiatiques, la pratique de telles techniques, qui ne sont toujours pas réellement réglementées en France, est encore mal intégrée dans les mœurs sur les autres continents, et est loin d'être soutenue par le ministère de la santé.

L'ensemble de ces données laisse donc fortement suspecter l'existence d'une plasticité neuronale ainsi que l'existence d'altérations au niveau central suite à une dénutrition précoce. Il est alors possible que l'intégrité des populations neuronales à des niveaux supérieurs du système SSR, i.e. les neurones sympathiques présynaptiques localisés dans la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière thoracique et les centres sympathiques moteurs du tronc cérébral et de

l'hypothalamus, soit modifiée. Selon la théorie du « thrifty phenotype », ces modifications centrales du système SSR viseraient à adapter son activité aux conditions précoces délétères, et, en agissant en amont des CC, pourraient alors participer aux altérations morphologiques, fonctionnelles, et géniques observées dans la médullosurrénale des animaux FR50 tout au long de leur vie.

## **CONCLUSION**

En conclusion, les travaux effectués au cours de cette thèse montrent clairement et pour la première fois que la dénutrition maternelle périnatale induit des modifications profondes de la différenciation des CC et de la mise en place de leur innervation, qui résultent en une hyperactivité de la médullosurrénale au sevrage. La majorité de ces adaptations persiste à l'âge adulte et programme un dysfonctionnement de la glande en réponse à un stress, ce qui pourrait fortement participer à l'étiologie des troubles du métabolisme cardiovasculaire et énergétique développés par ces animaux (figure 36). Nos observations contribuent ainsi à inscrire les adaptations du système SSR parmi les mécanismes potentiellement impliqués dans la programmation de pathologies apparentées au syndrome métabolique par les conditions développementales (figure 37). Devant l'urgence de la gestion de l'épidémie mondiale de « diabésité » (paragraphe I.A.1.), le régime FR50 constitue un modèle expérimental probant pour l'étude de l'origine précoce des adaptations du système SSR et de leurs effets à long terme, ainsi que pour la prévention et le traitement des troubles cardiovasculaires et métaboliques qui y sont associés. Par ailleurs, la poursuite de l'étude de ce modèle pathologique pourrait participer à l'identification de nouvelles molécules impliquées dans la régulation du développement et de l'activité des CC.

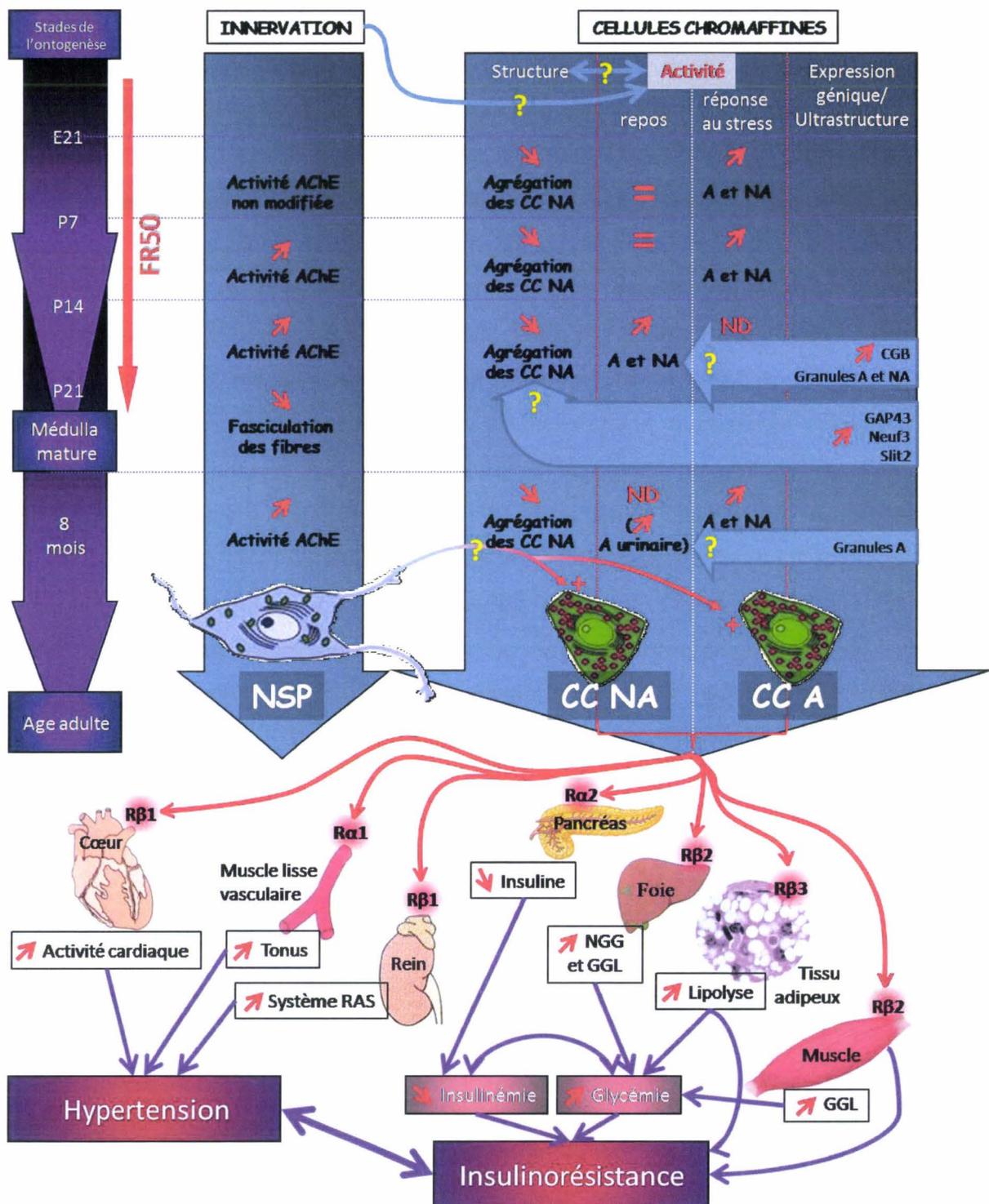


Figure 36 : Altérations des cellules chromaffines et de leur innervation chez les animaux FR50 et leurs possibles conséquences. Les flèches en bleu accompagnées d'un point d'interrogation suggèrent une influence possible de différents facteurs. Les effets potentiels d'une augmentation de l'activité des cellules chromaffines sur les différents organes impliqués dans le contrôle du métabolisme énergétique et cardiovasculaire sont figurés sur la partie inférieure du schéma. ↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; = : égale ; ND : non déterminé ; NSP : neurone sympathique préganglionnaire; NGG : néoglucogenèse ; GGL : glycogénolyse ; Rβ : récepteur β-adrénergique ; Ra : récepteur α-adrénergique.

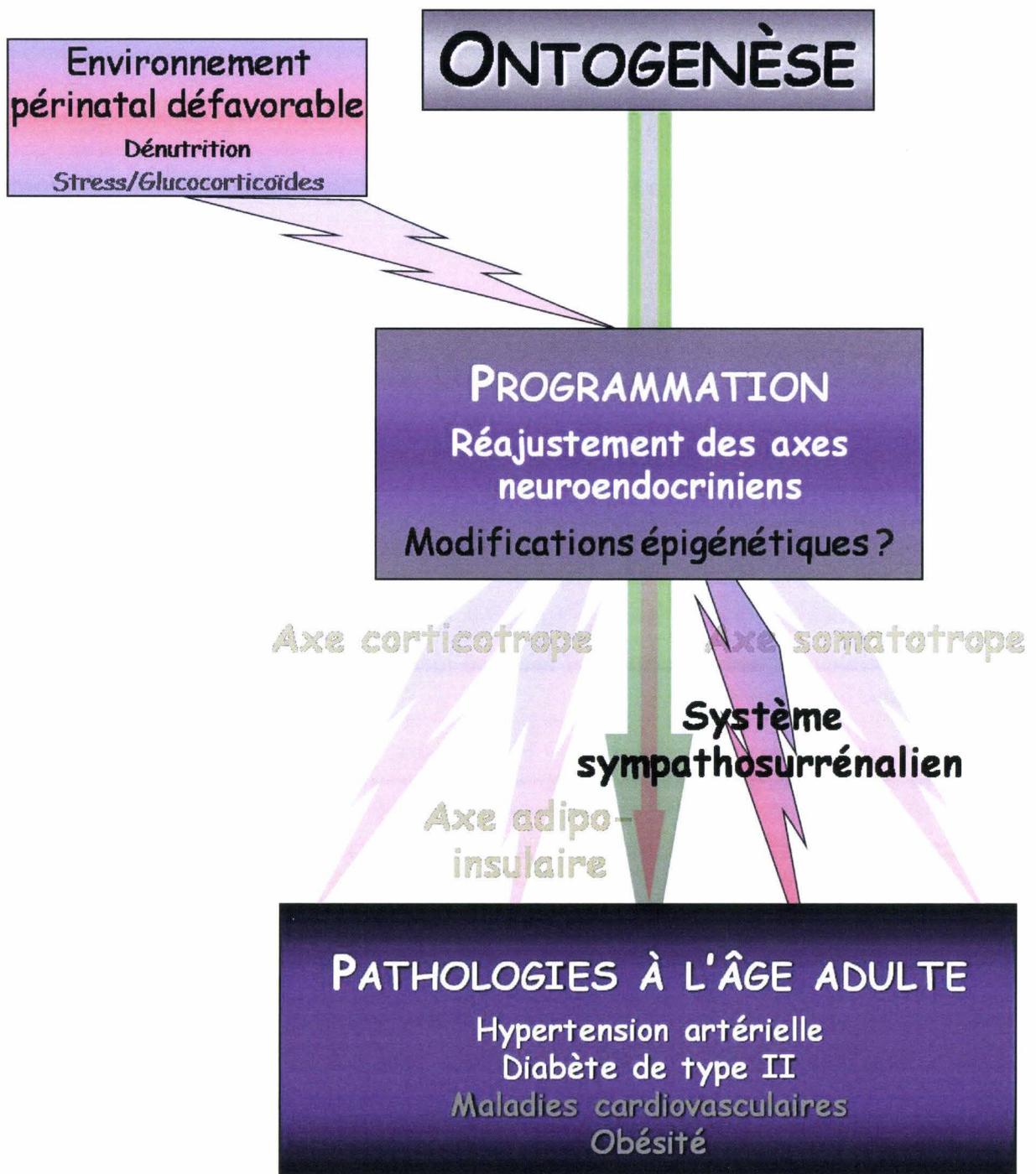


Figure 37 : Le système sympathosurrénalien, un des mécanismes possibles de programmation précoce de pathologies à l'âge adulte

## Bibliographie

## A

**Ahren,B.** (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* **43**, 393-410.

**Allen,M.T., Matthews,K.A., and Sherman,F.S.** (1997). Cardiovascular reactivity to stress and left ventricular mass in youth. *Hypertension* **30**, 782-787.

**Amann,K., Wanner,C., and Ritz,E.** (2006). Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2112-2119.

**Anderson,D.J.** (1993a). Cell fate determination in the peripheral nervous system: the sympathoadrenal progenitor. *J. Neurobiol.* **24**, 185-198.

**Anderson,D.J.** (1993b). Molecular control of cell fate in the neural crest: the sympathoadrenal lineage. *Annu. Rev. Neurosci.* **16**, 129-158.

**Anderson,D.J. and Axel,R.** (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* **47**, 1079-1090.

**Anderson,D.J., Groves,A., Lo,L., Ma,Q., Rao,M., Shah,N.M., and Sommer,L.** (1997). Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **62**, 493-504.

**Arner,P.** (2005). Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* **19**, 471-482.

**Aunis,D. and Langley,K.** (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand.* **167**, 89-97.

**Austin,K.B., Bronzino,J., and Morgane,P.J.** (1986). Prenatal protein malnutrition affects synaptic potentiation in the dentate gyrus of rats in adulthood. *Brain Res.* **394**, 267-273.

## B

**Bagby,S.P.** (2007). Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming. *J. Nutr.* **137**, 1066-1072.

**Bagdade,J.D., Bierman,E.L., and Porte,D., Jr.** (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J. Clin. Invest* **46**, 1549-1557.

**Ballesta,J.J., Borges,R., Garcia,A.G., and Hidalgo,M.J.** (1989). Secretory and radioligand binding studies on muscarinic receptors in bovine and feline chromaffin cells. *J. Physiol* **418**, 411-426.

- Bao,X., Lu,C.M., Liu,F., Gu,Y., Dalton,N.D., Zhu,B.Q., Foster,E., Chen,J., Karliner,J.S., Ross,J., Jr. et al.** (2007). Epinephrine is required for normal cardiovascular responses to stress in the phenylethanolamine N-methyltransferase knockout mouse. *Circulation* **116**, 1024-1031.
- Barembaum,M. and Bronner-Fraser,M.** (2005). Early steps in neural crest specification. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 642-646.
- Barker,D.J.** (2007). Obesity and early life. *Obes. Rev.* **8 Suppl 1**, 45-49.
- Barker,D.J.** (2002). Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol. Metab* **13**, 364-368.
- Barker,D.J.** (1998). In utero programming of chronic disease. *Clin. Sci. (Lond)* **95**, 115-128.
- Barker,D.J., Bull,A.R., Osmond,C., and Simmonds,S.J.** (1990). Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* **301**, 259-262.
- Barker,D.J., Gluckman,P.D., Godfrey,K.M., Harding,J.E., Owens,J.A., and Robinson,J.S.** (1993a). Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* **341**, 938-941.
- Barker,D.J., Hales,C.N., Fall,C.H., Osmond,C., Phipps,K., and Clark,P.M.** (1993b). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* **36**, 62-67.
- Barker,D.J., Martyn,C.N., Osmond,C., Hales,C.N., and Fall,C.H.** (1993c). Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ* **307**, 1524-1527.
- Barker,D.J. and Osmond,C.** (1988). Low birth weight and hypertension. *BMJ* **297**, 134-135.
- Barker,D.J., Osmond,C., Golding,J., Kuh,D., and Wadsworth,M.E.** (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* **298**, 564-567.
- Barnes,P.J. and Adcock,I.** (1993). Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 436-441.
- Bartel,D.P., Sheng,M., Lau,L.F., and Greenberg,M.E.** (1989). Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev.* **3**, 304-313.
- Bedi,K.S.** (2003). Nutritional effects on neuron numbers. *Nutr. Neurosci.* **6**, 141-152.
- Bedi,K.S.** (1992). Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. *Physiol Behav.* **51**, 1001-1007.
- Bedi,U.S. and Arora,R.** (2007). Cardiovascular manifestations of posttraumatic stress disorder. *J. Natl. Med. Assoc.* **99**, 642-649.
- Beierwaltes,W.H.** (2003). Sympathetic stimulation of renin is independent of direct regulation by renal nitric oxide. *Vascul. Pharmacol.* **40**, 43-49.

- Benowitz,L.I. and Routtenberg,A.** (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* **20**, 84-91.
- Berka,J.L., Kelly,D.J., Robinson,D.B., Alcorn,D., Marley,P.D., Fernley,R.T., and Skinner,S.L.** (1996). Adrenaline cells of the rat adrenal cortex and medulla contain renin and prorenin. *Mol. Cell Endocrinol.* **119**, 175-184.
- Bertin,R., Guastavino,J.M., and Portet,R.** (1990a). Effects of cold acclimation on the energetic metabolism of the staggerer mutant mouse. *Physiol Behav.* **47**, 377-380.
- Bertin,R., Mouroux,I., De,M.F., and Portet,R.** (1990b). Norepinephrine turnover in brown adipose tissue of young rats: effects of rearing temperature. *Am. J. Physiol* **259**, R90-R96.
- Bieger,S.C., Henkel,A.W., and Unsicker,K.** (1995). Localization of basic fibroblast growth factor in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* **64**, 1521-1527.
- Bilodeau,M.L., Boulineau,T., Hullinger,R.L., and Andrisani,O.M.** (2000). Cyclic AMP signaling functions as a bimodal switch in sympathoadrenal cell development in cultured primary neural crest cells. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3004-3014.
- Bjorntorp,P.** (1992). Abdominal fat distribution and the metabolic syndrome. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20 Suppl 8**, S26-S28.
- Blair,M.L.** (1981). Inhibition of renin secretion by intrarenal alpha-adrenoceptor blockade. *Am. J. Physiol* **240**, E682-E688.
- Blair,S.C., Caterson,I.D., and Cooney,G.J.** (1994). Effect of adrenalectomy on glucose tolerance and lipid metabolism in gold-thioglucose obese mice. *Am. J. Physiol* **266**, E993-1000.
- Blatt,G.J., Chen,J.C., Rosene,D.L., Volicer,L., and Galler,J.R.** (1994). Prenatal protein malnutrition effects on the serotonergic system in the hippocampal formation: an immunocytochemical, ligand binding, and neurochemical study. *Brain Res. Bull.* **34**, 507-518.
- Blaugrund,E., Pham,T.D., Tennyson,V.M., Lo,L., Sommer,L., Anderson,D.J., and Gershon,M.D.** (1996). Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Development* **122**, 309-320.
- Blondeau,B., Lesage,J., Czernichow,P., Dupouy,J.P., and Breant,B.** (2001). Glucocorticoids impair fetal beta-cell development in rats. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **281**, E592-E599.
- Blottner,D. and Unsicker,K.** (1989). Spatial and temporal patterns of neurotrophic activities in rat adrenal medulla and cortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **48**, 243-253.
- Blottner,D., Westermann,R., Grothe,C., Bohlen,P., and Unsicker,K.** (1989). Basic Fibroblast Growth Factor in the Adrenal Gland. *Eur. J. Neurosci.* **1**, 471-478.
- Blottner,D., Wolf,N., Lachmund,A., Flanders,K.C., and Unsicker,K.** (1996). TGF-beta rescues target-deprived preganglionic sympathetic neurons in the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 202-210.

- Blue,M.E. and Parnavelas,J.G.** (1983). The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *J. Neurocytol.* **12**, 697-712.
- Boesen,E.I., Anderson,W.P., and Kett,M.M.** (2007). Acute pressure-natriuresis relationship following withdrawal of chronic noradrenaline infusion. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **34**, 881-883.
- Bogdarina,I., Welham,S., King,P.J., Burns,S.P., and Clark,A.J.** (2007). Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ. Res.* **100**, 520-526.
- Bohn,M.C., Kessler,J.A., Golightly,L., and Black,I.B.** (1983). Appearance of enkephalin-immunoreactivity in rat adrenal medulla following treatment with nicotinic antagonists or reserpine. *Cell Tissue Res.* **231**, 469-479.
- Bolli,G.B. and Fanelli,C.G.** (1999). Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* **28**, 467-93, v.
- Boomsma,F. and Tipton,K.F.** (2007). Renalase, a catecholamine-metabolising enzyme? *J. Neural Transm.* **114**, 775-776.
- Bornstein,S.R. and Vaudry,H.** (1998). Paracrine and neuroendocrine regulation of the adrenal gland--basic and clinical aspects. *Horm. Metab Res.* **30**, 292-296.
- Bouret,S.G., Draper,S.J., and Simerly,R.B.** (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* **304**, 108-110.
- Bray,G.A., York,D.A., and Fisler,J.S.** (1989). Experimental obesity: a homeostatic failure due to defective nutrient stimulation of the sympathetic nervous system. *Vitam. Horm.* **45**, 1-125.
- Brito,M.N., Brito,N.A., Baro,D.J., Song,C.K., and Bartness,T.J.** (2007). Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. *Endocrinology.*
- Budihardjo,I., Oliver,H., Lutter,M., Luo,X., and Wang,X.** (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 269-290.
- Buj-Bello,A., Buchman,V.L., Horton,A., Rosenthal,A., and Davies,A.M.** (1995). GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* **15**, 821-828.
- 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. *Br. J. Nutr.* **97**, 435-439.

- Cammisotto,P.G., Bukowiecki,L.J., Deshaies,Y., and Bendayan,M.** (2006). Leptin biosynthetic pathway in white adipocytes. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 207-214.
- Campbell,L.F. and Bedi,K.S.** (1989). The effects of undernutrition during early life on spatial learning. *Physiol Behav.* **45**, 883-890.
- Cao,G.Y., Considine,R.V., Lynn,R.B.** (1997). Leptin receptors in the adrenal medulla of the rat. *Am J Physiol.* **273**, 448-52.
- Caroni,P.** (2001). New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J.* **20**, 4332-4336.
- Ceccatelli,S., Millhorn,D.E., Hokfelt,T., and Goldstein,M.** (1989). Evidence for the occurrence of an enkephalin-like peptide in adrenaline and noradrenaline neurons of the rat medulla oblongata. *Exp. Brain Res.* **74**, 631-640.
- Chamberlain,R. and Davey,A.** (1975). Physical growth in twins, postmature and small-for-dates children. *Arch. Dis. Child* **50**, 437-442.
- Chamson-Reig,A., Thyssen,S.M., Arany,E., and Hill,D.J.** (2006). Altered pancreatic morphology in the offspring of pregnant rats given reduced dietary protein is time and gender specific. *J. Endocrinol.* **191**, 83-92.
- Christiansen,J.H., Coles,E.G., and Wilkinson,D.G.** (2000). Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 719-724.
- Chwan Ng,A.C., Freedman,S.B., and Sindone,A.P.** (2007). Autonomic abnormalities in congestive heart failure patients with sleep-disordered breathing. *J. Card Fail.* **13**, 395-400.
- Citterio,L., Azzani,T., Duga,S., and Bianchi,G.** (1999). Genomic organization of the human gamma adducin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 110-114.
- Clarke,M.C., Harley,M., and Cannon,M.** (2006). The role of obstetric events in schizophrenia. *Schizophr. Bull.* **32**, 3-8.
- Clement,K. and Langin,D.** (2007). Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue. *J. Intern. Med.* **262**, 422-430.
- Cole,T.J., Blendy,J.A., Monaghan,A.P., Krieglstein,K., Schmid,W., Aguzzi,A., Fantuzzi,G., Hummler,E., Unsicker,K., and Schutz,G.** (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* **9**, 1608-1621.
- Combs,S.E., Ernsberger,U., Krieglstein,K., and Unsicker,K.** (2001). Reduction of endogenous TGF-beta does not affect phenotypic development of sympathoadrenal progenitors into adrenal chromaffin cells. *Mech. Dev.* **109**, 295-302.
- Conboy,V.B., Santer,R.M., and Swift,G.L.** (1987). Effects of prenatal undernutrition on prevertebral sympathetic neurons in the rat: a morphological and fluorescence histochemical study. *J. Anat.* **154**, 47-53.

- Considine,R.V.** (1997). Weight regulation, leptin and growth hormone. *Horm. Res.* **48 Suppl 5**, 116-121.
- Considine,R.V. and Caro,J.F.** (1997). Leptin and the regulation of body weight. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 1255-1272.
- Considine,R.V., Sinha,M.K., Heiman,M.L., Kriauciunas,A., Stephens,T.W., Nyce,M.R., Ohannesian,J.P., Marco,C.C., McKee,L.J., Bauer,T.L. et al.** (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292-295.
- Cordero,M.E., Trejo,M., Garcia,E., Barros,T., Rojas,A.M., and Colombo,M.** (1986). Dendritic development in the neocortex of adult rats following a maintained prenatal and/or early postnatal life undernutrition. *Early Hum. Dev.* **14**, 245-258.
- Cornell,R.A. and Eisen,J.S.** (2005). Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 663-672.
- Cottrell,E.C. and Ozanne,S.E.** (2007). Developmental programming of energy balance and the metabolic syndrome. *Proc. Nutr. Soc.* **66**, 198-206.
- Coulombe,J.N. and Kos,K.** (1997). Target tissue influence on somatostatin expression in the avian ciliary ganglion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **814**, 209-225.
- Coulombe,J.N., Schwall,R., Parent,A.S., Eckenstein,F.P., and Nishi,R.** (1993). Induction of somatostatin immunoreactivity in cultured ciliary ganglion neurons by activin in choroid cell-conditioned medium. *Neuron* **10**, 899-906.
- Coupé,B., Dutriez-Casteloot,I., Breton,C., Lefèvre,F., Mairesse,J., Dickes-Coopman,A., Silhol,M., Tapia-Arancibia,L., Vieau,D., and Lesage,J.** (2007). Maternal undernutrition modifies brain-derived neurotrophic factorexpression and cellular proliferation in the hippocampus and hypothalamus of the developing rat. *Eur. J. Neurosci.* En soumission.
- Coupland,R.E.** (1965). Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. I. The ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla. *J. Anat.* **99**, 231-254.
- Cowen,T. and Gavazzi,I.** (1998). Plasticity in adult and ageing sympathetic neurons. *Prog. Neurobiol.* **54**, 249-288.
- Crane,J.F. and Trainor,P.A.** (2006). Neural crest stem and progenitor cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 267-286.
- Crivellato,E., Belloni,A., Nico,B., Nussdorfer,G.G., and Ribatti,D.** (2004). Chromaffin granules in the rat adrenal medulla release their secretory content in a particulate fashion. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **277**, 204-208.
- Crivellato,E., Civinini,A., and Gallo,V.P.** (2006a). Chromaffin cells in the adrenal homolog of *Aphanius fasciatus* (teleost fish) express piecemeal degranulation in response to osmotic stress: a hint for a conservative evolutionary process. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **288**, 1077-1086.

**Crivellato,E., Guidolin,D., Nico,B., Nussdorfer,G.G., and Ribatti,D.** (2006b). Fine ultrastructure of chromaffin granules in rat adrenal medulla indicative of a vesicle-mediated secretory process. *Anat. Embryol. (Berl)* **211**, 79-86.

**Crivellato,E., Nico,B., Perissin,L., and Ribatti,D.** (2003). Ultrastructural morphology of adrenal chromaffin cells indicative of a process of piecemeal degranulation. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **270**, 103-108.

**Curhan,G.C., Willett,W.C., Rimm,E.B., Spiegelman,D., Ascherio,A.L., and Stampfer,M.J.** (1996). Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation* **94**, 3246-3250.

## D

**Dagerlind,A., Goldstein,M., and Hokfelt,T.** (1990). Most ganglion cells in the rat adrenal medulla are noradrenergic. *Neuroreport* **1**, 137-140.

**Das,U.N.** (2005). Pathophysiology of metabolic syndrome X and its links to the perinatal period. *Nutrition* **21**, 762-773.

**Dayan,P. and Yu,A.J.** (2006). Phasic norepinephrine: a neural interrupt signal for unexpected events. *Network*. **17**, 335-350.

**de Arruda Camargo,L.A., Saad,W.A., and de,S., V** (2004). Interaction between paraventricular nucleus and medial septal area on the renal effects induced by adrenaline. *Auton. Neurosci.* **111**, 135-139.

**De Bellard,M.E., Rao,Y., and Bronner-Fraser,M.** (2003). Dual function of Slit2 in repulsion and enhanced migration of trunk, but not vagal, neural crest cells. *J. Cell Biol.* **162**, 269-279.

**de Bold,A.J., Borenstein,H.B., Veress,A.T., and Sonnenberg,H.** (1981). A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* **28**, 89-94.

**de la Cour,C.D., Norlen,P., and Hakanson,R.** (2007). Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger compounds: A microdialysis study. *Regul. Pept.* **143**, 118-126.

**de Castro,F.** (2003). Chemotropic molecules: guides for axonal pathfinding and cell migration during CNS development. *News Physiol Sci.* **18**, 130-136.

**De., V, Shkhvatsabaia,I.K., Iureneva,A.P., Salenko,B.B., and Khramelashvili,V.V.** (1986). [Left ventricular hypertrophy and neural tonus in hypertension: differences in the action of diuretics and relaxation therapy]. *Kardiologiya.* **26**, 34-39.

**de Rooij, Sr., Painter,R.C., Phillips,D.I., Osmond,C., Michels,R.P., Bossuyt,P.M., Bleker,O.P., and Roseboom,T.J.** (2006a). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adults who were prenatally exposed to the Dutch famine. *Eur. J. Endocrinol.* **155**, 153-160.

- de Rooij, Sr., Painter,R.C., Phillips,D.I., Osmond,C., Michels,R.P., Godsland,I.F., Bossuyt,P.M., Bleker,O.P., and Roseboom,T.J. (2006b). Impaired insulin secretion after prenatal exposure to the Dutch famine. *Diabetes Care* **29**, 1897-1901.
- de Rooij, Sr., Painter,R.C., Phillips,D.I., Osmond,C., Tanck,M.W., Bossuyt,P.M., and Roseboom,T.J. (2006c). Cortisol responses to psychological stress in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Psychoneuroendocrinology* **31**, 1257-1265.
- de Rooij, Sr., Painter,R.C., Roseboom,T.J., Phillips,D.I., Osmond,C., Barker,D.J., Tanck,M.W., Michels,R.P., Bossuyt,P.M., and Bleker,O.P. (2006). Glucose tolerance at age 58 and the decline of glucose tolerance in comparison with age 50 in people prenatally exposed to the Dutch famine. *Diabetologia* **49**, 637-643.
- Debassio,W.A. and Kemper,T.L. (1985). The effects of protein deprivation on neuronal migration in rats. *Brain Res.* **352**, 191-196.
- Debassio,W.A., Kemper,T.L., Galler,J.R., and Tonkiss,J. (1994). Prenatal malnutrition effect on pyramidal and granule cell generation in the hippocampal formation. *Brain Res. Bull.* **35**, 57-61.
- Declercq,J., Hensen,K., Van,D., V, and Chavez,M. (2003). PLAG proteins: how they influence apoptosis and cell proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**, 264-265.
- Dejda,A., Sokolowska,P., and Nowak,J.Z. (2005). Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacol. Rep.* **57**, 307-320.
- Del Rio G. (2000). Adrenomedullary function and its regulation in obesity. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **24 Suppl 2**, S89-S91.
- Delahaye,F., Breton,C., Risold,P.Y., Enache,M., Dutriez-Casteloot,I., Laborie,C., Lesage,J. and Vieau,D. (2007). Maternal Perinatal Undernutrition Impedes Postnatal Leptin Surge and Affects the Development of Arcuate Nucleus POMC Neurons in Neonatal Male Rat Pups. *Endocrinology*. En soumission
- Delannet,M. and Duband,J.L. (1992). Transforming growth factor-beta control of cell-substratum adhesion during avian neural crest cell emigration in vitro. *Development* **116**, 275-287.
- DeQuattro,V. and Feng,M. (2002). The sympathetic nervous system: the muse of primary hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **16 Suppl 1**, S64-S69.
- DeQuattro,V., Lee,D.D., Shkhvatsabaya,I.K., Yurenev,A.P., Salenko,B.B., Allen,J., Azen,S., Barndt,R., Foti,A., and Davison,G. (1988). Primary hypertension: left ventricular mass and function, sympathetic nervous system activity, and therapy. *Health Psychol.* **7 Suppl**, 165-173.
- Derkx,F.H. and Schalekamp,M.A. (1997). More on renin. *Clin. Chem.* **43**, 694-697.
- Diatchenko,L., Lau,Y.F., Campbell,A.P., Chenchik,A., Moqadam,F., Huang,B., Lukyanov,S., Lukyanov,K., Gurskaya,N., Sverdlov,E.D. *et al.* (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 6025-6030.

- Diaz-Cintra,S., Cintra,L., Kemper,T., Resnick,O., and Morgane,P.J.** (1981). The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res.* **221**, 243-255.
- Dobbing,J.** (1974). The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* **53**, 2-6.
- Dobbing,J. and Sands,J.** (1971). Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biol. Neonate* **19**, 363-378.
- Dobbing,J. and Smart,J.L.** (1974). Vulnerability of developing brain and behaviour. *Br. Med. Bull.* **30**, 164-168.
- Dodic,M., Abouantoun,T., O'Connor,A., Wintour,E.M., and Moritz,K.M.** (2002a). Programming effects of short prenatal exposure to dexaméthasone in sheep. *Hypertension* **40**, 729-734.
- Dodic,M., Hantzis,V., Duncan,J., Rees,S., Koukoulas,I., Johnson,K., Wintour,E.M., and Moritz,K.** (2002b). Programming effects of short prenatal exposure to cortisol. *FASEB J.* **16**, 1017-1026.
- Donovan,S.L., Mamounas,L.A., Andrews,A.M., Blue,M.E., and McCasland,J.S.** (2002). GAP-43 is critical for normal development of the serotonergic innervation in forebrain. *J. Neurosci.* **22**, 3543-3552.
- Dorsey,D.A. and Schmidt,R.E.** (1993). Correlation of GAP-43 immunoreactivity with subpopulations of chromaffin cells in rat adrenal medulla. *Neurosci. Lett.* **162**, 29-33.
- Douglas,W.W. and Rubin,R.P.** (1961a). Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature* **192**, 1087-1089.
- Douglas,W.W. and Rubin,R.P.** (1961b). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol* **159**, 40-57.
- Doupe,A.J., Landis,S.C., and Patterson,P.H.** (1985a). Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J. Neurosci.* **5**, 2119-2142.
- Doupe,A.J., Patterson,P.H., and Landis,S.C.** (1985b). Small intensely fluorescent cells in culture: role of glucocorticoids and growth factors in their development and interconversions with other neural crest derivatives. *J. Neurosci.* **5**, 2143-2160.
- Dowse,G.K., Zimmet,P.Z., Finch,C.F., and Collins,V.R.** (1991). Decline in incidence of epidemic glucose intolerance in Nauruans: implications for the "thrifty genotype". *Am. J. Epidemiol.* **133**, 1093-1104.
- Dudas,B., Semeniken,K.R., and Merchenthaler,I.** (2006). Morphological substrate of the catecholaminergic input of the vasopressin neuronal system in humans. *J. Neuroendocrinol.* **18**, 895-901.

**Dumont,M., Day,R., and Lemaire,S.** (1983). Distinct distribution of immunoreactive dynorphin and leucine enkephalin in various populations of isolated adrenal cromaffin cells. *Life Sci.* **32**, 287-294.

**Dutriez-Casteloot,I., Breton,C., Coupé,B., Hawchar,O., Enache,M., Dickes-Coopman,A., de Keyzer,Y., Deloof,S., Lesage,J., and Vieau,D.** (2007). Tissue-specific programming expression of glucocorticoid receptors and 11 $\beta$ -HSDs by maternal perinatal undernutrition in the HPA axis adult male rat. *Horm. Metab Res.*

## E

**Ebert,S.N., Balt,S.L., Hunter,J.P., Gashler,A., Sukhatme,V., and Wong,D.L.** (1994). Egr-1 activation of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 20885-20898.

**Edwards,L.J. and McMillen,I.C.** (2001). Maternal undernutrition increases arterial blood pressure in the sheep fetus during late gestation. *J. Physiol* **533**, 561-570.

**Eikelis,N. and Esler,M.** (2005). The neurobiology of human obesity. *Exp. Physiol* **90**, 673-682.

**Eikelis,N., Lambert,G., Wiesner,G., Kaye,D., Schlaich,M., Morris,M., Hastings,J., Socratous,F., and Esler,M.** (2004). Extra-adipocyte leptin release in human obesity and its relation to sympathoadrenal function. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **286**, E744-E752.

**Eikelis,N., Schlaich,M., Aggarwal,A., Kaye,D., and Esler,M.** (2003). Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension* **41**, 1072-1079.

**Erickson,J.D., Schafer,M.K., Bonner,T.I., Eiden,L.E., and Weihe,E.** (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 5166-5171.

**Eriksson,J.G.** (2006). Early growth, and coronary heart disease and type 2 diabetes: experiences from the Helsinki Birth Cohort Studies. *Int. J. Obes. (Lond)* **30 Suppl 4**, S18-S22.

**Ernfors,P., Merlio,J.P., and Persson,H.** (1992). Cells Expressing mRNA for Neurotrophins and their Receptors During Embryonic Rat Development. *Eur. J. Neurosci.* **4**, 1140-1158.

**Ernsberger,U., Patzke,H., Tissier-Seta,J.P., Reh,T., Goridis,C., and Rohrer,H.** (1995). The expression of tyrosine hydroxylase and the transcription factors cPhox-2 and Cash-1: evidence for distinct inductive steps in the differentiation of chick sympathetic precursor cells. *Mech. Dev.* **52**, 125-136.

**Esler,M., Julius,S., Randall,O., DeQuattro,V., and Zweifler,A.** (1976). High-renin essential hypertension: adrenergic cardiovascular correlates. *Clin. Sci. Mol. Med. Suppl* **3**, 181s-184s.

**Esler,M., Lambert,G., Brunner-La Rocca,H.P., Vaddadi,G., and Kaye,D.** (2003). Sympathetic nerve activity and neurotransmitter release in humans: translation from pathophysiology into clinical practice. *Acta Physiol Scand.* **177**, 275-284.

**Esler,M., Zweifler,A., Randall,O., and DeQuattro,V.** (1977). Pathophysiologic and pharmacokinetic determinants of the antihypertensive response to propranolol. *Clin. Pharmacol. Ther.* **22**, 299-308.

**Everson,S.A., Lynch,J.W., Chesney,M.A., Kaplan,G.A., Goldberg,D.E., Shade,S.B., Cohen,R.D., Salonen,R., and Salonen,J.T.** (1997). Interaction of workplace demands and cardiovascular reactivity in progression of carotid atherosclerosis: population based study. *BMJ* **314**, 553-558.

**Evinger,M.J., Ernsberger,P., Regunathan,S., Joh,T.H., and Reis,D.J.** (1994). A single transmitter regulates gene expression through two separate mechanisms: cholinergic regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA via nicotinic and muscarinic pathways. *J. Neurosci.* **14**, 2106-2116.

**Evinger,M.J. and Joh,T.H.** (1989). Strain-specific differences in transcription of the gene for the epinephrine-synthesizing enzyme phenylethanolamine N-methyltransferase. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **5**, 141-147.

## F

**Fagundes,A.T., Moura,E.G., Passos,M.C., Oliveira,E., Toste,F.P., Bonomo,I.T., Trevenzoli,I.H., Garcia,R.M., and Lisboa,P.C.** (2007). Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br. J. Nutr.* 1-7.

**Fan,T.J., Han,L.H., Cong,R.S., and Liang,J.** (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **37**, 719-727.

**Fann,M.J. and Patterson,P.H.** (1994). Depolarization differentially regulates the effects of bone morphogenetic protein (BMP)-2, BMP-6, and activin A on sympathetic neuronal phenotype. *J. Neurochem.* **63**, 2074-2079.

**Fann,M.J. and Patterson,P.H.** (1994). Neurotrophic cytokines and activin A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 43-47.

**Federoff,H.J., Grabczyk,E., and Fishman,M.C.** (1988). Dual regulation of GAP-43 gene expression by nerve growth factor and glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* **263**, 19290-19295.

**Fernald,L.C. and Grantham-McGregor,S.M.** (1998). Stress response in school-age children who have been growth retarded since early childhood. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 691-698.

**Fernald,L.C. and Grantham-McGregor,S.M.** (2002). Growth retardation is associated with changes in the stress response system and behavior in school-aged jamaican children. *J. Nutr.* **132**, 3674-3679.

**Ferrand,C., Redonnet,A., Prevot,D., Carpenne,C., and Atgie,C.** (2006). Prolonged treatment with the beta3-adrenergic agonist CL 316243 induces adipose tissue remodeling in rat but not in guinea pig: 1) fat store depletion and desensitization of beta-adrenergic responses. *J. Physiol Biochem.* **62**, 89-99.

- Finer,N.N., Craft,A., Vaucher,Y.E., Clark,R.H., and Sola,A.** (2000). Postnatal steroids: short-term gain, long-term pain? *J. Pediatr.* **137**, 9-13.
- Finotto,S., Krieglstein,K., Schober,A., Deimling,F., Lindner,K., Bruhl,B., Beier,K., Metz,J., Garcia-Ararras,J.E., Roig-Lopez,J.L. et al.** (1999). Analysis of mice carrying targeted mutations of the glucocorticoid receptor gene argues against an essential role of glucocorticoid signalling for generating adrenal chromaffin cells. *Development* **126**, 2935-2944.
- Fischer-Colbrie,R., Iacangelo,A., and Eiden,L.E.** (1988). Neural and humoral factors separately regulate neuropeptide Y, enkephalin, and chromogranin A and B mRNA levels in rat adrenal medulla. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 3240-3244.
- Fischer-Colbrie,R., Wohlfarter,T., Schmid,K.W., Grino,M., and Winkler,H.** (1989). Dexaméthasone induces an increased biosynthesis of chromogranin A in rat pituitary gland. *J. Endocrinol.* **121**, 487-494.
- Flanagan,D.E., Vaile,J.C., Petley,G.W., Moore,V.M., Godsland,I.F., Cockington,R.A., Robinson,J.S., and Phillips,D.I.** (1999). The autonomic control of heart rate and insulin resistance in young adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **84**, 1263-1267.
- Flegal,K.M., Carroll,M.D., Kuczmarski,R.J., and Johnson,C.L.** (1998). Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **22**, 39-47.
- Frey,D., Laux,T., Xu,L., Schneider,C., and Caroni,P.** (2000). Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J. Cell Biol.* **149**, 1443-1454.
- Frodin,M. and Gammeltoft,S.** (1994). Insulin-like growth factors act synergistically with basic fibroblast growth factor and nerve growth factor to promote chromaffin cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 1771-1775.
- Frodin,M., Hannibal,J., Wulff,B.S., Gammeltoft,S., and Fahrenkrug,J.** (1995). Neuronal localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 in the adrenal medulla and growth-inhibitory effect on chromaffin cells. *Neuroscience* **65**, 599-608.
- Fu,L., Isobe,K., Zeng,Q., Suzukawa,K., Takekoshi,K., and Kawakami,Y.** (2007). beta-adrenoceptor agonists downregulate adiponectin, but upregulate adiponectin receptor 2 and tumor necrosis factor-alpha expression in adipocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **569**, 155-162.

## G

- Galler,J.R., Shumsky,J.S., and Morgane,P.J.** (1997). Malnutrition and brain development. **14**, 196-212. 1997.

- Garces,C. and de Oya,,M.** (2007). [Cardiovascular risk factors in children. Main findings of the Four Provinces study]. *Rev. Esp. Cardiol.* **60**, 517-524.
- Garcia,V.M., Monasterolo,L.A., and Elias,M.M.** (2003). Renal vascular responsiveness to angiotensin II at an early stage of diabetes: interaction between intrarenal noradrenergic and renin-angiotensin systems. *Acta Diabetol.* **40**, 130-136.
- Garcia-Castro,M.I., Marcelle,C., and Bronner-Fraser,M.** (2002a). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* **297**, 848-851.
- Gardner,D.S., Tingey,K., Van Bon,B.W., Ozanne,S.E., Wilson,V., Dandrea,J., Keisler,D.H., Stephenson,T., and Symonds,M.E.** (2005). Programming of glucose-insulin metabolism in adult sheep after maternal undernutrition. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **289**, R947-R954.
- Garofano,A., Czernichow,P., and Breant,B.** (1999). Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia* **42**, 711-718.
- Gatford,K.L., Wintour,E.M., De Blasio,M.J., Owens,J.A., and Dodic,M.** (2000). Differential timing for programming of glucose homeostasis, sensitivity to insulin and blood pressure by in utero exposure to dexaméthasone in sheep. *Clin. Sci. (Lond)* **98**, 553-560.
- Gibson,T.B., Lawrence,M.C., Gibson,C.J., Vanderbilt,C.A., McGlynn,K., Arnette,D., Chen,W., Collins,J., Naziruddin,B., Levy,M.F. et al.** (2006). Inhibition of glucose-stimulated activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 by epinephrine in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **55**, 1066-1073.
- Gilardini,L., Parati,G., Sartorio,A., Mazzilli,G., Pontiggia,B., and Invitti,C.** (2007). Sympathoadrenergic and metabolic factors are involved in ambulatory blood pressure rise in childhood obesity. *J. Hum. Hypertens.*
- Gilbert,J.S., Ford,S.P., Lang,A.L., Pahl,L.R., Drumhiller,M.C., Babcock,S.A., Nathanielsz,P.W., and Nijland,M.J.** (2007). Nutrient restriction impairs nephrogenesis in a gender-specific manner in the ovine fetus. *Pediatr. Res.* **61**, 42-47.
- Giner,D., Lopez,I., Villanueva,J., Torres,V., Viniégra,S., and Gutierrez,L.M.** (2007). Vesicle movements are governed by the size and dynamics of F-actin cytoskeletal structures in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* **146**, 659-669.
- Glasow,A. and Bornstein,S.R.** (2000). Leptin and the adrenal gland. *Eur. J. Clin. Invest* **30 Suppl 3**, 39-45.
- Go,A.G., Chow,K.H., Hwang,I.S., and Tang,F.** (2007). Adrenomedullin and its receptor components in adipose tissues: Differences between white and brown fats and the effects of adrenergic stimulation. *Peptides* **28**, 920-927.
- Godfrey,K.M.** (2002). The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta* **23 Suppl A**, S20-S27.
- Gogo-Jack,S., Selke,G., Melson,A.K., and Newcomer,J.W.** (1997). Robust leptin secretory responses to dexaméthasone in obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **82**, 3230-3233.

- Goldstein,D.S., Holmes,C., Sharabi,Y., Brentzel,S., and Eisenhofer,G.** (2003). Plasma levels of catechols and metanephrines in neurogenic orthostatic hypotension. *Neurology* **60**, 1327-1332.
- Goldstein,D.S., Robertson,D., Esler,M., Straus,S.E., and Eisenhofer,G.** (2002). Dysautonomias: clinical disorders of the autonomic nervous system. *Ann. Intern. Med.* **137**, 753-763.
- Gopalakrishnan,G.S., Gardner,D.S., Rhind,S.M., Rae,M.T., Kyle,C.E., Brooks,A.N., Walker,R.M., Ramsay,M.M., Keisler,D.H., Stephenson,T. et al.** (2004). Programming of adult cardiovascular function after early maternal undernutrition in sheep. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **287**, R12-R20.
- Granholt,A.C., Srivastava,N., Mott,J.L., Henry,S., Henry,M., Westphal,H., Pichel,J.G., Shen,L., and Hoffer,B.J.** (1997). Morphological alterations in the peripheral and central nervous systems of mice lacking glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): immunohistochemical studies. *J. Neurosci.* **17**, 1168-1178.
- Grant,N.J., Claudepierre,T., Aunis,D., and Langley,K.** (1996). Glucocorticoids and nerve growth factor differentially modulate cell adhesion molecule L1 expression in PC12 cells. *J. Neurochem.* **66**, 1400-1408.
- Grant,N.J., Konig,F., Aunis,D., and Langley,K.** (1994). Expression of GAP-43 (neuromodulin) during the development of the rat adrenal gland. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **82**, 265-276.
- Grothe,C. and Unsicker,K.** (1989). Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine adrenal gland, ovary, and pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* **37**, 1877-1883.
- Grothe,C. and Unsicker,K.** (1990). Immunocytochemical mapping of basic fibroblast growth factor in the developing and adult rat adrenal gland. *Histochemistry* **94**, 141-147.
- Groves,A.K., George,K.M., Tissier-Seta,J.P., Engel,J.D., Brunet,J.F., and Anderson,D.J.** (1995). Differential regulation of transcription factor gene expression and phenotypic markers in developing sympathetic neurons. *Development* **121**, 887-901.
- Grumolato,L., Elkahoulun,A.G., Ghzili,H., Alexandre,D., Coulouarn,C., Yon,L., Salier,J.P., Eiden,L.E., Fournier,A., Vaudry,H. et al.** (2003). Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in pheochromocytoma cells reveal pleiotropic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cell proliferation, survival, and adhesion. *Endocrinology* **144**, 2368-2379.
- Grumolato,L., Louiset,E., Alexandre,D., it-Ali,D., Turquier,V., Fournier,A., Fasolo,A., Vaudry,H., and Anouar,Y.** (2003). PACAP and NGF regulate common and distinct traits of the sympathoadrenal lineage: effects on electrical properties, gene markers and transcription factors in differentiating PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 71-82.
- Guillemot,F., Lo,L.C., Johnson,J.E., Auerbach,A., Anderson,D.J., and Joyner,A.L.** (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* **75**, 463-476.

**Gustavson,S.M., Chu,C.A., Nishizawa,M., Farmer,B., Neal,D., Yang,Y., Donahue,E.P., Flakoll,P., and Cherrington,A.D.** (2003a). Interaction of glucagon and epinephrine in the control of hepatic glucose production in the conscious dog. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **284**, E695-E707.

**Gustavson,S.M., Chu,C.A., Nishizawa,M., Farmer,B., Neal,D., Yang,Y., Vaughan,S., Donahue,E.P., Flakoll,P., and Cherrington,A.D.** (2003b). Glucagon's actions are modified by the combination of epinephrine and gluconeogenic precursor infusion. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **285**, E534-E544.

## H

**Hafner,E., Metzenbauer,M., Hofinger,D., Munkel,M., Gassner,R., Schuchter,K., Ilinger-Paller,B., and Philipp,K.** (2003). Placental growth from the first to the second trimester of pregnancy in SGA-foetuses and pre-eclamptic pregnancies compared to normal foetuses. *Placenta* **24**, 336-342.

**Hahn,P. and Kirby,L.** (1973). Immediate and late effects of premature weaning and of feeding a high fat or high carbohydrate diet to weanling rats. *J. Nutr.* **103**, 690-696.

**Hales,C.N. and Barker,D.J.** (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601.

**Hales,C.N. and Barker,D.J.** (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* **60**, 5-20.

**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.

**Hales,C.N. and Ozanne,S.E.** (2003). The dangerous road of catch-up growth. *J. Physiol* **547**, 5-10.

**Halleux,C.M., Servais,I., Reul,B.A., Detry,R., and Brichard,S.M.** (1998). Multihormonal control of ob gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue: increased responsiveness to glucocorticoids in obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 902-910.

**Hamelink,C., Tjurmina,O., Damadzic,R., Young,W.S., Weihe,E., Lee,H.W., and Eiden,L.E.** (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and gluchohomeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 461-466.

**Harel,Z. and Tannenbaum,G.S.** (1993). Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone release in the rat. *Endocrinology* **133**, 1035-1043.

**Harel,Z. and Tannenbaum,G.S.** (1995). Long-term alterations in growth hormone and insulin secretion after temporary dietary protein restriction in early life in the rat. *Pediatr. Res.* **38**, 747-753.

**Harris,M.L. and Erickson,C.A.** (2007). Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Dev. Dyn.* **236**, 1-19.

- Hausberg,M., Hoffman,R.P., Somers,V.K., Sinkey,C.A., Mark,A.L., and Anderson,E.A.** (1997). Contrasting autonomic and hemodynamic effects of insulin in healthy elderly versus young subjects. *Hypertension* **29**, 700-705.
- Head,R.J.** (1989). Hypernoradrenergic innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels* **26**, 1-20.
- Hedborg,F., Ohlsson,R., Sandstedt,B., Grimelius,L., Hoehner,J.C., and Pahlman,S.** (1995). IGF2 expression is a marker for paraganglionic/SIF cell differentiation in neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* **146**, 833-847.
- Heim,C. and Nemeroff,C.B.** (1999). The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol. Psychiatry* **46**, 1509-1522.
- Hendy,G.N., Li,T., Girard,M., Feldstein,R.C., Mulay,S., Desjardins,R., Day,R., Karaplis,A.C., Tremblay,M.L., and Canaff,L.** (2006). Targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene: normal neuroendocrine dense-core secretory granules and increased expression of other granins. *Mol. Endocrinol.* **20**, 1935-1947.
- Henion,P.D. and Landis,S.C.** (1990). Asynchronous appearance and topographic segregation of neuropeptide-containing cells in the developing rat adrenal medulla. *J. Neurosci.* **10**, 2886-2896.
- Henion,P.D. and Landis,S.C.** (1992). Developmental regulation of leucine-enkephalin expression in adrenal chromaffin cells by glucocorticoids and innervation. *J. Neurosci.* **12**, 3818-3827.
- Hercberg,S.** (1997). [Antioxidant micronutrients and chronic degenerative pathology: the role of complementary nutritional doses]. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* **152**, 379-385.
- Hercberg,S., Galan,P., Preziosi,P., Roussel,A.M., Arnaud,J., Richard,M.J., Malvy,D., Paul-Dauphin,A., Briancon,S., and Favier,A.** (1998a). Background and rationale behind the SU.VI.MAX Study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. SUPPLEMENTATION EN VITAMINES ET MINERAUX ANTIOXYDANTS Study. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **68**, 3-20.
- Hercberg,S., Preziosi,P., Briancon,S., Galan,P., Triol,I., Malvy,D., Roussel,A.M., and Favier,A.** (1998b). A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: the SU.VI.MAX study--design, methods, and participant characteristics. SUPPLEMENTATION EN VITAMINES ET MINERAUX ANTIOXYDANTS. *Control Clin. Trials* **19**, 336-351.
- Herlein,J.A., Morgan,D.A., Phillips,B.G., Haynes,W.G., and Sivitz,W.I.** (2006). Antecedent hypoglycemia, catecholamine depletion, and subsequent sympathetic neural responses. *Endocrinology* **147**, 2781-2788.
- Hervonen,A., Linnoila,I., Vaalasti,A., Alho,H., and Pelto-Huikko,M.** (1989). Electron microscopic localization of enkephalin-like immunoreactivity in the human adrenal medulla. *J. Electron Microsc. Tech.* **12**, 380-388.

- Higuchi,H., Nakano,K., Kim,C.H., Li,B.S., Kuo,C.H., Taira,E., and Miki,N.** (1996). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent transcriptional activation of neuropeptide Y gene induced by membrane depolarization: determination of Ca(2+)- and cyclic AMP/phorbol 12-myristate 13-acetate-responsive elements. *J. Neurochem.* **66**, 1802-1809.
- Hirose,H., Seto,Y., Maruyama,H., Dan,K., Nakamura,K., and Saruta,T.** (1997). Effects of alpha 2-adrenergic agonism, imidazolines, and G-protein on insulin secretion in beta cells. *Metabolism* **46**, 1146-1149.
- Hirsch,M.R., Tiveron,M.C., Guillemot,F., Brunet,J.F., and Goriadis,C.** (1998). Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* **125**, 599-608.
- Hirsch,S.** (2007). A different approach to resistant hypertension. *Cleve. Clin. J. Med.* **74**, 449-456.
- Holgert,H., Dagerlind,A., and Hokfelt,T.** (1996). Phenotype of intraadrenal ganglion neurons during postnatal development in rat. *J. Comp Neurol.* **371**, 603-620.
- Holm,C., Osterlund,T., Laurell,H., and Contreras,J.A.** (2000). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 365-393.
- Holt,R.I.** (2002). Fetal programming of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Trends Endocrinol. Metab* **13**, 392-397.
- Horlick,M.B., Rosenbaum,M., Nicolson,M., Levine,L.S., Fedun,B., Wang,J., Pierson,R.N., Jr., and Leibel,R.L.** (2000). Effect of puberty on the relationship between circulating leptin and body composition. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **85**, 2509-2518.
- Howard,M.J. and Bronner-Fraser,M.** (1985). The influence of neural tube-derived factors on differentiation of neural crest cells in vitro. I. Histochemical study on the appearance of adrenergic cells. *J. Neurosci.* **5**, 3302-3309.
- Howard,M.J. and Bronner-Fraser,M.** (1986). Neural tube-derived factors influence differentiation of neural crest cells in vitro: effects on activity of neurotransmitter biosynthetic enzymes. *Dev. Biol.* **117**, 45-54.
- Hu,H.** (1999). Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* **23**, 703-711.
- Huang,Z.Y., Wu,Y., Burke,S.P., and Gutmann,D.H.** (2003). The 43000 growth-associated protein functions as a negative growth regulator in glioma. *Cancer Res.* **63**, 2933-2939.
- Huber,K.** (2006). The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev. Biol.* **298**, 335-343.
- Huber,K., Bruhl,B., Guillemot,F., Olson,E.N., Ernsberger,U., and Unsicker,K.** (2002a). Development of chromaffin cells depends on MASH1 function. *Development* **129**, 4729-4738.
- Huber,K., Combs,S., Ernsberger,U., Kalcheim,C., and Unsicker,K.** (2002b). Generation of neuroendocrine chromaffin cells from sympathoadrenal progenitors: beyond the glucocorticoid hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **971**, 554-559.

**Huh,Y.H., Jeon,S.H., and Yoo,S.H.** (2003). Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **278**, 40581-40589.

**Hwa,V., Oh,Y., and Rosenfeld,R.G.** (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* **20**, 761-787.

**Hwang,O. and Choi,H.J.** (1995). Induction of gene expression of the catecholamine-synthesizing enzymes by insulin-like growth factor-I. *J. Neurochem.* **65**, 1988-1996.

## I

**Inoue,M., Fujishiro,N., Ogawa,K., Muroi,M., Sakamoto,Y., Imanaga,I., and Shioda,S.** (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide may function as a neuromodulator in guinea-pig adrenal medulla. *J. Physiol* **528**, 473-487.

**Iversen,L.L., De,C.J., Glowinski,J., and Axelrod,J.** (1967). Uptake, storage and metabolism of norepinephrine in tissues of the developing rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **157**, 509-516.

## J

**Jacob,F., LaBine,B.G., Ariza,P., Katz,S.A., and Osborn,J.W.** (2005). Renal denervation causes chronic hypotension in rats: role of beta1-adrenoceptor activity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **32**, 255-262.

**Janig,W. and McLachlan,E.M.** (1992). Specialized functional pathways are the building blocks of the autonomic nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* **41**, 3-13.

**Jansson,T. and Powell,T.L.** (2007). Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin. Sci. (Lond)* **113**, 1-13.

**Jimenez-Chillaron,J.C., Hernandez-Valencia,M., Reamer,C., Fisher,S., Joszi,A., Hirshman,M., Oge,A., Walrond,S., Przybyla,R., Boozer,C. et al.** (2005). Beta-cell secretory dysfunction in the pathogenesis of low birth weight-associated diabetes: a murine model. *Diabetes* **54**, 702-711.

**Joels,M. and De Kloet,E.R.** (1989). Effects of glucocorticoids and norepinephrine on the excitability in the hippocampus. *Science* **245**, 1502-1505.

**Johansson,S., Norman,M., Legnevall,L., Dalmaz,Y., Lagercrantz,H., and Vanpee,M.** (2007). Increased catecholamines and heart rate in children with low birth weight: perinatal contributions to sympathoadrenal overactivity. *J. Intern. Med.* **261**, 480-487.

**Jones,A., Beda,A., Ward,A.M., Osmond,C., Phillips,D.I., Moore,V.M., and Simpson,D.M.** (2007). Size at birth and autonomic function during psychological stress. *Hypertension* **49**, 548-555.

**Jones,C. and Judd,B.** (2006). Long-term follow-up of extremely low birth weight infants. *Pediatr. Nephrol.* **21**, 299.

**Jordan,T.C. and Clark,G.A.** (1983). Early undernutrition impairs hippocampal long-term potentiation in adult rats. *Behav. Neurosci.* **97**, 319-322.

**Julius,S. and Gudbrandsson,T.** (1992). Early association of sympathetic overactivity, hypertension, insulin resistance, and coronary risk. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20 Suppl 8**, S40-S48.

**Jung,D.J., Bong,J.J., and Baik,M.** (2004). Extracellular proteinase inhibitor-accelerated apoptosis is associated with B cell activating factor in mammary epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **292**, 115-122.

**Junien,C.** (2006). Impact of diets and nutrients/drugs on early epigenetic programming. *J. Inherit. Metab Dis.* **29**, 359-365.

**Junien,C., Gallou-Kabani,C., Vige,A., and Gross,M.S.** (2005). [Nutritional epigenomics of metabolic syndrome]. *Med. Sci. (Paris)* **21 Spec No**, 44-52.

## K

**Kaiser,H.W., O'Keefe,E., and Bennett,V.** (1989). Adducin: Ca<sup>++</sup>-dependent association with sites of cell-cell contact. *J. Cell Biol.* **109**, 557-569.

**Kajantie,E.** (2006). Fetal origins of stress-related adult disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1083**, 11-27.

**Kalcheim,C.** (2000). Mechanisms of early neural crest development: from cell specification to migration. *Int. Rev. Cytol.* **200**, 143-196.

**Kalcheim,C. and Burstyn-Cohen,T.** (2005). Early stages of neural crest ontogeny: formation and regulation of cell delamination. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 105-116.

**Kalra,S.P., Dube,M.G., Pu,S., Xu,B., Horvath,T.L., and Kalra,P.S.** (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev.* **20**, 68-100.

**Kamarck,T.W., Eranen,J., Jennings,J.R., Manuck,S.B., Everson,S.A., Kaplan,G.A., and Salonen,J.T.** (2000). Anticipatory blood pressure responses to exercise are associated with left ventricular mass in Finnish men: Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation* **102**, 1394-1399.

**Kanda,H., Tateya,S., Tamori,Y., Kotani,K., Hiasa,K., Kitazawa,R., Kitazawa,S., Miyachi,H., Maeda,S., Egashira,K. et al.** (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest* **116**, 1494-1505.

**Kang,L. and Nagy,L.E.** (2006). Chronic ethanol feeding suppresses beta-adrenergic receptor-stimulated lipolysis in adipocytes isolated from epididymal fat. *Endocrinology* **147**, 4330-4338.

**Karnovsky,M.J. and Roots,L.** (1964). A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 219-221.

- Kawamura,H., Tomori,H., Naruse,Y., Maki,M., Komatsu,K., Hara,K., Mitsubayashi,H., Suzuki,K., Ito,S., Miyagawa,M. et al.** (1991). Dietary sodium concentration modifies catecholamine release with stress in spontaneously hypertensive rats. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* **33**, 873-878.
- Kawamura,M., Itoh,H., Yura,S., Mogami,H., Suga,S., Makino,H., Miyamoto,Y., Yoshimasa,Y., Sagawa,N., and Fujii,S.** (2007). Undernutrition in utero augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring: possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental origins of cardiovascular disease. *Endocrinology* **148**, 1218-1225.
- Kearney,T. and Dang,C.** (2007). Diabetic and endocrine emergencies. *Postgrad. Med. J.* **83**, 79-86.
- Kelsh,R.N.** (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays* **28**, 788-798.
- Khorram,O., Khorram,N., Momeni,M., Han,G., Halem,J., Desai,M., and Ross,M.G.** (2007). Maternal undernutrition inhibits angiogenesis in the offspring: a potential mechanism of programmed hypertension. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **293**, R745-R753.
- Kilbourne,E.J., McMahon,A., and Sabban,E.L.** (1991). Membrane depolarization by isotonic or hypertonic KCl: differential effects on mRNA levels of tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase mRNA in PC12 cells. *J. Neurosci. Methods* **40**, 193-202.
- Kim,T., Tao-Cheng,J.H., Eiden,L.E., and Loh,Y.P.** (2001). Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* **106**, 499-509.
- Kim,T., Zhang,C.F., Sun,Z., Wu,H., and Loh,Y.P.** (2005). Chromogranin A deficiency in transgenic mice leads to aberrant chromaffin granule biogenesis. *J. Neurosci.* **25**, 6958-6961.
- Kind,K.L., Clifton,P.M., Grant,P.A., Owens,P.C., Sohlstrom,A., Roberts,C.T., Robinson,J.S., and Owens,J.A.** (2003). Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **284**, R140-R152.
- Kind,K.L., Simonetta,G., Clifton,P.M., Robinson,J.S., and Owens,J.A.** (2002). Effect of maternal feed restriction on blood pressure in the adult guinea pig. *Exp. Physiol* **87**, 469-477.
- King,J.A., Lush,D.J., and Fray,J.C.** (1993). Regulation of renin processing and secretion: chemiosmotic control and novel secretory pathway. *Am. J. Physiol* **265**, C305-C320.
- Kloosterman,G.J.** (1970). [Continued or intermittent use of contraceptives]. *Ned. Tijdschr. Verloskd. Gynaecol.* **70**, 576-583.
- Kralisch,S., Klein,J., Lossner,U., Bluher,M., Paschke,R., Stumvoll,M., and Fasshauer,M.** (2006a). Isoproterenol stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Regul. Pept.* **135**, 12-16.

**Kralisch,S., Lossner,U., Bluher,M., Paschke,R., Stumvoll,M., and Fasshauer,M.** (2006b). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression and secretion are induced by beta-adrenergic stimulation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Endocrinol.* **189**, 665-670.

**Kriegstein,K., Deimling,F., Suter-Crazzolaro,C., and Unsicker,K.** (1996). Expression and localization of GDNF in developing and adult adrenal chromaffin cells. *Cell Tissue Res.* **286**, 263-268.

**Krishnaveni,G.V., Hill,J.C., Leary,S.D., Veena,S.R., Saperia,J., Saroja,A., Karat,S.C., and Fall,C.H.** (2005). Anthropometry, glucose tolerance, and insulin concentrations in Indian children: relationships to maternal glucose and insulin concentrations during pregnancy. *Diabetes Care* **28**, 2919-2925.

**Kuramoto,H., Kondo,H., and Fujita,T.** (1987). Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in scattered chromaffin cells and nerve fibers in the adrenal gland of rats. *Cell Tissue Res.* **247**, 309-315.

**Kvetnansky,R., Pacak,K., Fukuhara,K., Viskupic,E., Hiremagalur,B., Nankova,B., Goldstein,D.S., Sabban,E.L., and Kopin,I.J.** (1995). Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **771**, 131-158.

**Kyle,U.G. and Pichard,C.** (2006). The Dutch Famine of 1944-1945: a pathophysiological model of long-term consequences of wasting disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* **9**, 388-394.

## L

**La Gamma,E.F. and Black,I.B.** (1989). Transcriptional control of adrenal catecholamine and opiate peptide transmitter genes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **5**, 17-22.

**LaBonne,C.** (2002). Vertebrate development: wnt signals at the crest. *Curr. Biol.* **12**, R743-R744.

**Lajic,S., Wedell,A., Bui,T.H., Ritzen,E.M., and Holst,M.** (1998). Long-term somatic follow-up of prenatally treated children with congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 3872-3880.

**Langley,K. and Grant,N.J.** (1999). Molecular markers of sympathoadrenal cells. *Cell Tissue Res.* **298**, 185-206.

**Langley,K. and Grant,N.J.** (1997). Are exocytosis mechanisms neurotransmitter specific? *Neurochem. Int.* **31**, 739-757.

**Langley,K. and Grant,N.J.** (1995). Do adrenergic chromaffin cells exocytose like noradrenergic cells? *Trends Neurosci.* **18**, 440-441.

**Langley-Evans,S.C., Langley-Evans,A.J., and Marchand,M.C.** (2003). Nutritional programming of blood pressure and renal morphology. *Arch. Physiol Biochem.* **111**, 8-16.

**Launay,S., Hermine,O., Fontenay,M., Kroemer,G., Solary,E., and Garrido,C.** (2005). Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* **24**, 5137-5148.

- Laux,T., Fukami,K., Thelen,M., Golub,T., Frey,D., and Caroni,P.** (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell Biol.* **149**, 1455-1472.
- Le Douarin N., Le,L.C., and Fontaine,J.** (1972). [Experimental research on the embryologic origin of the carotid body in birds]. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **275**, 583-586.
- Le Douarin,N.M., Creuzet,S., Couly,G., and Dupin,E.** (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* **131**, 4637-4650.
- Le Douarin,N.M. and Dupin,E.** (2003). Multipotentiality of the neural crest. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 529-536.
- Le Roith,D., Scavo,L., and Butler,A.** (2001). What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol. Metab* **12**, 48-52.
- Lee,M.J., Wang,Y., Ricci,M.R., Sullivan,S., Russell,C.D., and Fried,S.K.** (2007). Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexaméthasone in human adipose tissue. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **292**, E858-E864.
- Lemaire,S., Chouinard,L., Mercier,P., and Day,R.** (1986). Bombesin-like immunoreactivity in bovine adrenal medulla. *Regul. Pept.* **13**, 133-146.
- Leon,C., Grant,N., Aunis,D., and Langley,K.** (1992a). L1 Cell Adhesion Molecule is Expressed by Noradrenergic but not Adrenergic Chromaffin Cells: A Possible Major Role for L1 in Adrenal Medullary Design. *Eur. J. Neurosci.* **4**, 201-209.
- Leon,C., Grant,N.J., Aunis,D., and Langley,K.** (1992b). Expression of cell adhesion molecules and catecholamine synthesizing enzymes in the developing rat adrenal gland. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **70**, 109-121.
- Léonhardt,M.** (2003). Conséquences neuroendocriniennes et métaboliques d'une sous-nutrition maternelle périnatale chez le rat. Thèse.
- Leonhardt,M., Lesage,J., Croix,D., Dutriez-Casteloot,I., Beauvillain,J.C., and Dupouy,J.P.** (2003). Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol. Reprod.* **68**, 390-400.
- Leonhardt,M., Lesage,J., Dufourny,L., ckes-Coopman,A., Montel,V., and Dupouy,J.P.** (2002). Perinatal maternal food restriction induces alterations in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and in plasma corticosterone-binding globulin capacity of weaning rat pups. *Neuroendocrinology* **75**, 45-54.
- Lesage,J., Blondeau,B., Grino,M., Breant,B., and Dupouy,J.P.** (2001). Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* **142**, 1692-1702.
- Lesage,J., Dufourny,L., Laborie,C., Bernet,F., Blondeau,B., Avril,I., Breant,B., and Dupouy,J.P.** (2002). Perinatal malnutrition programs sympathoadrenal and hypothalamic-

pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress in adult male rats. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 135-143.

**Lesage,J., Hahn,D., Leonhardt,M., Blondeau,B., Breant,B., and Dupouy,J.P.** (2002f). Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. *J. Endocrinol.* **174**, 37-43.

**Lesage,J., Sebaai,N., Leonhardt,M., Dutriez-Casteloot,I., Breton,C., Deloof,S., and Vieau,D.** (2006). Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress.* **9**, 183-198.

**Lewis,P.D., Patel,A.J., and Balazs,R.** (1979). Effect of undernutrition on cell generation in the rat hippocampus. *Brain Res.* **168**, 186-189.

**Lo,L., Tiveron,M.C., and Anderson,D.J.** (1998). MASH1 activates expression of the paired homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. *Development* **125**, 609-620.

**Lomax,R.B., Michelena,P., Nunez,L., Garcia-Sancho,J., Garcia,A.G., and Montiel,C.** (1997). Different contributions of L- and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels to Ca<sup>2+</sup> signals and secretion in chromaffin cell subtypes. *Am. J. Physiol* **272**, C476-C484.

**Londos,C., Gruia-Gray,J., Brasaemle,D.L., Rondinone,C.M., Takeda,T., Dwyer,N.K., Barber,T., Kimmel,A.R., and Blanchette-Mackie,E.J.** (1996). Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **20 Suppl 3**, S97-101.

**Lorenzo,H.K., Susin,S.A., Penninger,J., and Kroemer,G.** (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death. Differ.* **6**, 516-524.

**Lumey,L.H.** (1998). Reproductive outcomes in women prenatally exposed to undernutrition: a review of findings from the Dutch famine birth cohort. *Proc. Nutr. Soc.* **57**, 129-135.

**Lundberg,J.M., Hokfelt,T., Hensen,A., Theodorsson-Norheim,E., Pernow,J., Hamberger,B., and Goldstein,M.** (1986). Neuropeptide Y-like immunoreactivity in adrenaline cells of adrenal medulla and in tumors and plasma of pheochromocytoma patients. *Regul. Pept.* **13**, 169-182.

## M

**Maack,T. and Kleinert,H.D.** (1986). Renal and cardiovascular effects of atrial natriuretic factor. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2057-2064.

- MacArthur,L., Koller,K.J., and Eiden,L.E.** (1993). Enkephalin gene transcription in bovine chromaffin cells is regulated by calcium and protein kinase A signal transduction pathways: identification of DNase I-hypersensitive sites. *Mol. Pharmacol.* **44**, 545-551.
- Magiakou,M.A. and Chrousos,G.P.** (1994). Corticosteroid therapy, nonendocrine disease, and corticosteroid withdrawal. *Curr. Ther. Endocrinol. Metab* **5**, 120-124.
- Magiakou,M.A., Smyrnaki,P., and Chrousos,G.P.** (2006). Hypertension in Cushing's syndrome. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* **20**, 467-482.
- Maiter,D.** (2004). Pheochromocytoma: a paradigm for catecholamine-mediated hypertension. *Acta Clin. Belg.* **59**, 209-219.
- Majane,E.A., Alho,H., Kataoka,Y., Lee,C.H., and Yang,H.Y.** (1985). Neuropeptide Y in bovine adrenal glands: distribution and characterization. *Endocrinology* **117**, 1162-1168.
- Malendowicz,L.K., Rucinski,M., Belloni,A.S., Ziolkowska,A., and Nussdorfer,G.G.** (2007). Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int. Rev. Cytol.* **263**, 63-102.
- Malhotra,R.K. and Wakade,A.R.** (1987a). Non-cholinergic component of rat splanchnic nerves predominates at low neuronal activity and is eliminated by naloxone. *J. Physiol* **383**, 639-652.
- Malhotra,R.K. and Wakade,A.R.** (1987b). Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the secretion of catecholamines from the rat adrenal gland. *J. Physiol* **388**, 285-294.
- Malhotra,R.K., Wakade,T.D., and Wakade,A.R.** (1988). Comparison of secretion of catecholamines from the rat adrenal medulla during continuous exposure to nicotine, muscarine or excess K. *Neuroscience* **26**, 313-320.
- Mamet,J., Peyronnet,J., Roux,J.C., Perrin,D., Cottet-Emard,J.M., Pequignot,J.M., Lagercrantz,H., and Dalmaz,Y.** (2002). Long-term prenatal hypoxia alters maturation of adrenal medulla in rat. *Pediatr. Res.* **51**, 207-214.
- Manojilvic,M., Hristic,M., Kalafatic,D., Plecas,B., and Ugresic,N.** (1998). The influence of dexaméthasone treatment of pregnant rats on the development of chromaffin tissue in their offspring during the fetal and neonatal period. *J. Endocrinol. Invest* **21**, 211-218.
- Marcas,A.C., Grassioli,S., da Rocha,D.N., Puzzi,M.A., Gravena,C., Scomparin,D.X., and de Freitas Mathias,P.C.** (2006). The dual effect of isoproterenol on insulin release is suppressed in pancreatic islets from hypothalamic obese rats. *Endocrine.* **29**, 445-449.
- Mark,A.L., Rahmouni,K., Correia,M., and Haynes,W.G.** (2003). A leptin-sympathetic-leptin feedback loop: potential implications for regulation of arterial pressure and body fat. *Acta Physiol Scand.* **177**, 345-349.
- Marley,P.D. and Livett,B.G.** (1987). Differences between the mechanisms of adrenaline and noradrenaline secretion from isolated, bovine, adrenal chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* **77**, 81-86.
- Martorell,R., Stein,A.D., and Schroeder,D.G.** (2001). Early nutrition and later adiposity. *J. Nutr.* **131**, 874S-880S.

- Matias,I., Leonhardt,M., Lesage,J., De,P.L., Dupouy,J.P., Vieau,D., and Di,M., V** (2003). Effect of maternal under-nutrition on pup body weight and hypothalamic endocannabinoid levels. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 382-389.
- Mayer,S.E.** (1970). Adrenergic receptors for metabolic responses in the heart. *Fed. Proc.* **29**, 1367-1372.
- McCance,D.R., Pettitt,D.J., Hanson,R.L., Jacobsson,L.T., Bennett,P.H., and Knowler,W.C.** (1994a). Glucose, insulin concentrations and obesity in childhood and adolescence as predictors of NIDDM. *Diabetologia* **37**, 617-623.
- McCance,D.R., Pettitt,D.J., Hanson,R.L., Jacobsson,L.T., Knowler,W.C., and Bennett,P.H.** (1994b). Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ* **308**, 942-945.
- McCance,R.A. and Widdowson,E.M.** (1974). The determinants of growth and form. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **185**, 1-17.
- McEwen,B.S. and Sapolsky,R.M.** (1995). Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 205-216.
- McKenzie,J.C., Tanaka,I., Misono,K.S., and Inagami,T.** (1985). Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the kidney, adrenal medulla, pituitary, and atrium of rat. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 828-832.
- McMillen,I.C., Adams,M.B., Ross,J.T., Coulter,C.L., Simonetta,G., Owens,J.A., Robinson,J.S., and Edwards,L.J.** (2001). Fetal growth restriction: adaptations and consequences. *Reproduction.* **122**, 195-204.
- Menezes,A., Zeman,R., and Sabban,E.** (1996). Involvement of intracellular or extracellular calcium in activation of tyrosine hydroxylase gene expression in PC12 cells. *J. Neurochem.* **67**, 2316-2324.
- Menkes,M.S., Matthews,K.A., Krantz,D.S., Lundberg,U., Mead,L.A., Qaqish,B., Liang,K.Y., Thomas,C.B., and Pearson,T.A.** (1989). Cardiovascular reactivity to the cold pressor test as a predictor of hypertension. *Hypertension* **14**, 524-530.
- Michael,G.J. and Priestley,J.V.** (1996). Expression of trkA and p75 nerve growth factor receptors in the adrenal gland. *Neuroreport* **7**, 1617-1622.
- Michelena,P., Moro,M.A., Castillo,C.J., and Garcia,A.G.** (1991). Muscarinic receptors in separate populations of noradrenaline- and adrenaline-containing chromaffin cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 913-919.
- Michelsohn,A.M. and Anderson,D.J.** (1992). Changes in competence determine the timing of two sequential glucocorticoid effects on sympathoadrenal progenitors. *Neuron* **8**, 589-604.
- Molendi-Coste,O., Grumolato,L., Laborie,C., Lesage,J., Maubert,E., Ghzili,H., Vaudry,H., Anouar,Y., Breton,C., and Vieau,D.** (2006). Maternal perinatal undernutrition alters neuronal and neuroendocrine differentiation in the rat adrenal medulla at weaning. *Endocrinology* **147**, 3050-3059.

- Molendi-Coste,O., Mairesse,J., Aubert,N., Ghzili,H., Abbadie,C., Vaudry,H., Gonzales,B., Anouar,Y., Vieau,D., Breton,C. and Laborie,C.** (2007). Maternal perinatal undernutrition impairs chromaffin cells proliferation in the postnatal rat. *Horm. Metab. Res.* *Accepted*.
- Molendi-Coste,O., Laborie,C., Scarpa,M.C., Montel,V., Vieau,D. and Breton,C.** (2008). Maternal perinatal undernutrition alters postnatal development of chromaffin cells in the rat adrenal medulla. *J Neuroendoc.* En cours de rédaction.
- Moller,K. and Sundler,F.** (1996). Expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and PACAP type I receptors in the rat adrenal medulla. *Regul. Pept.* **63**, 129-139.
- Monteiro,P.O. and Victora,C.G.** (2005). Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review. *Obes. Rev.* **6**, 143-154.
- Moosavi,S.M. and Johns,E.J.** (2003). The effect of isoprenaline infusion on renal renin and angiotensinogen gene expression in the anaesthetised rat. *Exp. Physiol* **88**, 221-227.
- Morgane,P.J., Justin-LaFrance,R., Bronzino,J., Tonkiss,J., Az-Cintra,S., Cintra,L., Kemper,T., and Galler,J.R.** (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **17**, 91-128.
- Morin,X., Cremer,H., Hirsch,M.R., Kapur,R.P., Goridis,C., and Brunet,J.F.** (1997). Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene Phox2a. *Neuron* **18**, 411-423.
- Morris,D. and Grossman,A.** (2002). The medical management of Cushing's syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **970**, 119-133.
- Morsink,M.C., Joels,M., Sarabdjitsingh,R.A., Meijer,O.C., De Kloet,E.R., and Datson,N.A.** (2006). The dynamic pattern of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional responses in neuronal PC12 cells. *J. Neurochem.* **99**, 1282-1298.
- Muaku,S.M., Thissen,J.P., Gerard,G., Ketelslegers,J.M., and Maiter,D.** (1997). Postnatal catch-up growth induced by growth hormone and insulin-like growth factor-I in rats with intrauterine growth retardation caused by maternal protein malnutrition. *Pediatr. Res.* **42**, 370-377.
- Mukoyama,M., Nakao,K., Yamada,T., Itoh,H., Hosoda,K., Saito,Y., Sugawara,A., Arai,H., Shirakami,G., Morii,N. et al.** (1988). Preparation of monoclonal antibodies against atrial natriuretic polypeptide precursor and application to highly sensitive sandwich enzyme immunoassay. *J. Hypertens. Suppl* **6**, S320-S322.

## N

- Nagamoto-Combs,K., Piech,K.M., Best,J.A., Sun,B., and Tank,A.W.** (1997). Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic AMP-responsive element and AP1 sites following calcium influx. Evidence for cyclic amp-responsive element binding protein-independent regulation. *J. Biol. Chem.* **272**, 6051-6058.

**Narkiewicz,K., Phillips,B.G., Kato,M., Hering,D., Bieniaszewski,L., and Somers,V.K.** (2005). Gender-selective interaction between aging, blood pressure, and sympathetic nerve activity. *Hypertension* **45**, 522-525.

**Neel,J.V.** (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am. J. Hum. Genet.* **14**, 353-362.

**Nelson,M.R. and Creutz,C.E.** (1995). Combinatorial mutagenesis of the four domains of annexin IV: effects on chromaffin granule binding and aggregating activities. *Biochemistry* **34**, 3121-3132.

**Nieto,M.A.** (2001). The early steps of neural crest development. *Mech. Dev.* **105**, 27-35.

**Nishimura,R., Nakagami,T., Tominaga,M., Yoshiike,N., and Tajima,N.** (2007). Prevalence of metabolic syndrome and optimal waist circumference cut-off values in Japan. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **78**, 77-84.

**Nunez,L., De La Fuente,M.T., Garcia,A.G., and Garcia-Sancho,J.** (1995). Differential Ca<sup>2+</sup> responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues. *Am. J. Physiol* **269**, C1540-C1546.

## O

**O'Connor,D.M., Blache,D., Hoggard,N., Brookes,E., Wooding,F.B., Fowden,A.L., and Forhead,A.J.** (2007). Developmental control of plasma leptin and adipose leptin messenger ribonucleic acid in the ovine fetus during late gestation: role of glucocorticoids and thyroid hormones. *Endocrinology* **148**, 3750-3757.

**Oestreicher,A.B., De Graan,P.N., Gispen,W.H., Verhaagen,J., and Schrama,L.H.** (1997). B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **53**, 627-686.

**Ogura,K., Irahara,M., Kiyokawa,M., Tezuka,M., Matsuzaki,T., Yasui,T., Kamada,M., and Aono,T.** (2001). Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells. *Eur. J. Endocrinol.* **144**, 653-658.

**Onoue,S., Endo,K., Ohshima,K., Yajima,T., and Kashimoto,K.** (2002a). The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides* **23**, 1471-1478.

**Onoue,S., Ohshima,K., Endo,K., Yajima,T., and Kashimoto,K.** (2002b). PACAP protects neuronal PC12 cells from the cytotoxicity of human prion protein fragment 106-126. *FEBS Lett.* **522**, 65-70.

**Onoue,S., Waki,Y., Nagano,Y., Satoh,S., and Kashimoto,K.** (2001). The neuromodulatory effects of VIP/PACAP on PC-12 cells are associated with their N-terminal structures. *Peptides* **22**, 867-872.

**Onso-Cortina,V.L., Gonzalez-Vazquez,L.O., Cabal,A., Esteban,I., Del,V., and Vega,J.A.** (1995). Immunoreactivity for beta/A4 protein, but not for its precursor, in human chromaffin cells. *Brain Res. Bull.* **37**, 449-455.

- Osborn,J.L., DiBona,G.F., and Thames,M.D.** (1981). Beta-1 receptor mediation of renin secretion elicited by low-frequency renal nerve stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **216**, 265-269.
- Ostlund,R.E., Jr., Yang,J.W., Klein,S., and Gingerich,R.** (1996). Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **81**, 3909-3913.
- Ozanne,S.E. and Hales,C.N.** (2002). Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol. Metab* **13**, 368-373.
- Ozanne,S.E. and Hales,C.N.** (2002b). Pre- and early postnatal nongenetic determinants of type 2 diabetes. *Expert. Rev. Mol. Med.* **4**, 1-14.
- Ozdinler,P.H. and Erzurumlu,R.S.** (2002). Slit2, a branching-arborization factor for sensory axons in the Mammalian CNS. *J. Neurosci.* **22**, 4540-4549.

## P

- Paffenbarger,R.S., Jr., Thorne,M.C., and Wing,A.L.** (1968). Chronic disease in former college students. VIII. Characteristics in youth predisposing to hypertension in later years. *Am. J. Epidemiol.* **88**, 25-32.
- Painter,R.C., de,R., Sr., Bossuyt,P.M., Phillips,D.I., Osmond,C., Barker,D.J., Bleker,O.P., and Roseboom,T.J.** (2006). Blood pressure response to psychological stressors in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *J. Hypertens.* **24**, 1771-1778.
- Paralkar,V.M., Weeks,B.S., Yu,Y.M., Kleinman,H.K., and Reddi,A.H.** (1992). Recombinant human bone morphogenetic protein 2B stimulates PC12 cell differentiation: potentiation and binding to type IV collagen. *J. Cell Biol.* **119**, 1721-1728.
- Pasquali,R., Vicennati,V., Cacciari,M., and Pagotto,U.** (2006). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1083**, 111-128.
- Patzke,H., Reissmann,E., Stanke,M., Bixby,J.L., and Ernsberger,U.** (2001). BMP growth factors and Phox2 transcription factors can induce synaptotagmin I and neurexin I during sympathetic neuron development. *Mech. Dev.* **108**, 149-159.
- Peach,M.J.** (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev.* **57**, 313-370.
- Pelto-Huikko,M., Salminen,T., and Hervonen,A.** (1985). Localization of enkephalins in adrenaline cells and the nerves innervating adrenaline cells in rat adrenal medulla. *Histochemistry* **82**, 377-383.
- Perides,G., Safran,R.M., Downing,L.A., and Charness,M.E.** (1994). Regulation of neural cell adhesion molecule and L1 by the transforming growth factor-beta superfamily. Selective effects of the bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 765-770.

- Peterson,H.R., Rothschild,M., Weinberg,C.R., Fell,R.D., McLeish,K.R., and Pfeifer,M.A.** (1988). Body fat and the activity of the autonomic nervous system. *N. Engl. J. Med.* **318**, 1077-1083.
- Petry,C.J., Dorling,M.W., Wang,C.L., Pawlak,D.B., and Ozanne,S.E.** (2000). Catecholamine levels and receptor expression in low protein rat offspring. *Diabet. Med.* **17**, 848-853.
- Phillips,D.I.** (2007). Programming of the stress response: a fundamental mechanism underlying the long-term effects of the fetal environment? *J. Intern. Med.* **261**, 453-460.
- Phillips,D.I. and Barker,D.J.** (1997). Association between low birthweight and high resting pulse in adult life: is the sympathetic nervous system involved in programming the insulin resistance syndrome? *Diabet. Med.* **14**, 673-677.
- Phillips,D.I., Hirst,S., Clark,P.M., Hales,C.N., and Osmond,C.** (1994). Fetal growth and insulin secretion in adult life. *Diabetologia* **37**, 592-596.
- Phillips,D.I. and Jones,A.** (2006). Fetal programming of autonomic and HPA function: do people who were small babies have enhanced stress responses? *J. Physiol* **572**, 45-50.
- Phillips,D.I., Jones,A., and Goulden,P.A.** (2006). Birth weight, stress, and the metabolic syndrome in adult life. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1083**, 28-36.
- Phipps,K., Barker,D.J., Hales,C.N., Fall,C.H., Osmond,C., and Clark,P.M.** (1993). Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia* **36**, 225-228.
- Poltorak,M. and Freed,W.J.** (1990). Cell adhesion molecules in adrenal medulla grafts: enhancement of chromaffin cell L1/Ng-CAM expression and reorganization of extracellular matrix following transplantation. *Exp. Neurol.* **110**, 73-85.
- Poltorak,M., Shimoda,K., and Freed,W.J.** (1990). Cell adhesion molecules (CAMs) in adrenal medulla in situ and in vitro: enhancement of chromaffin cell L1/Ng-CAM expression by NGF. *Exp. Neurol.* **110**, 52-72.
- Pombo,M., Pombo,C.M., Garcia,A., Caminos,E., Gualillo,O., Alvarez,C.V., Casanueva,F.F., and Dieguez,C.** (2001). Hormonal control of growth hormone secretion. *Horm. Res.* **55 Suppl 1**, 11-16.
- Porter,A.G. and Janicke,R.U.** (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death. Differ.* **6**, 99-104.
- Przywara,D.A., Kulkarni,J.S., Wakade,T.D., Leontiev,D.V., and Wakade,A.R.** (1998). Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and nerve growth factor use the proteasome to rescue nerve growth factor-deprived sympathetic neurons cultured from chick embryos. *J. Neurochem.* **71**, 1889-1897.

## Q

**Qvisth,V., Hagstrom-Toft,E., Enoksson,S., Moberg,E., Arner,P., and Bolinder,J.** (2006). Human skeletal muscle lipolysis is more responsive to epinephrine than to norepinephrine stimulation in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **91**, 665-670.

## R

**Rahhal,B., Dunker,N., Combs,S., and Krieglstein,K.** (2004). Isoform-specific role of transforming growth factor-beta2 in the regulation of proliferation and differentiation of murine adrenal chromaffin cells in vivo. *J. Neurosci. Res.* **78**, 493-498.

**Raible,D.W.** (2006). Development of the neural crest: achieving specificity in regulatory pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 698-703.

**Raible,D.W. and Ragland,J.W.** (2005). Reiterated Wnt and BMP signals in neural crest development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 673-682.

**Raposo, P.D., White,R.B., and Aubert,M.L.** (2003). The melanocortin agonist Melanotan-II reduces the orexigenic and adipogenic effects of neuropeptide Y (NPY) but does not affect the NPY-driven suppressive effects on the gonadotropic and somatotrophic axes in the male rat. *J. Neuroendocrinol.* **15**, 173-181.

**Rasch,B., Dodt,C., Molle,M., and Born,J.** (2007). Sleep-stage-specific regulation of plasma catecholamine concentration. *Psychoneuroendocrinology.*

**Ravelli,A.C., van der Meulen,J.H., Michels,R.P., Osmond,C., Barker,D.J., Hales,C.N., and Bleker,O.P.** (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* **351**, 173-177.

**Reissmann,E., Ernsberger,U., Francis-West,P.H., Rueger,D., Brickell,P.M., and Rohrer,H.** (1996). Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* **122**, 2079-2088.

**Reusens,B. and Remacle,C.** (2006). Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 913-922.

**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.

**Robert,D.F. and Bear,J.C.** (1997). Studies of Modern Man. *Annual Review of Anthropology.* **1**, 55-112.

**Roglic,G., Unwin,N., Bennett,P.H., Mathers,C., Tuomilehto,J., Nag,S., Connolly,V., and King,H.** (2005). The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care* **28**, 2130-2135.

**Rohn,T.T., Cusack,S.M., Kessinger,S.R., and Oxford,J.T.** (2004). Caspase activation independent of cell death is required for proper cell dispersal and correct morphology in PC12 cells. *Exp. Cell Res.* **295**, 215-225.

**Roisin,M.P., Artola,A., Henry,J.P., and Rossier,J.** (1983). Enkephalins are associated with adrenergic granules in bovine adrenal medulla. *Neuroscience* **10**, 83-88.

**Rokaeus,A., Pruss,R.M., and Eiden,L.E.** (1990). Galanin gene expression in chromaffin cells is controlled by calcium and protein kinase signaling pathways. *Endocrinology* **127**, 3096-3102.

**Rolland-Cachera,M.F., Deheeger,M., Maillot,M., and Bellisle,F.** (2006). Early adiposity rebound: causes and consequences for obesity in children and adults. *Int. J. Obes. (Lond)* **30 Suppl 4**, S11-S17.

**Rudolph,A.M.** (1984). The fetal circulation and its response to stress. *J. Dev. Physiol* **6**, 11-19.

## S

**Sanders,E.J. and Wride,M.A.** (1996). Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *Histochem. J.* **28**, 275-281.

**Santer,R.M. and Conboy,V.B.** (1990). Prenatal undernutrition permanently decreases enteric neuron number and sympathetic innervation of Auerbach's plexus in the rat. *J. Anat.* **168**, 57-62.

**Sauka-Spengler,T. and Bronner-Fraser,M.** (2006). Development and evolution of the migratory neural crest: a gene regulatory perspective. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 360-366.

**Schober,A., Krieglstein,K., and Unsicker,K.** (2000). Molecular cues for the development of adrenal chromaffin cells and their preganglionic innervation. *Eur. J. Clin. Invest* **30 Suppl 3**, 87-90.

**Schober,A., Minichiello,L., Keller,M., Huber,K., Layer,P.G., Roig-Lopez,J.L., Garcia-Ararras,J.E., Klein,R., and Unsicker,K.** (1997). Reduced acetylcholinesterase (AChE) activity in adrenal medulla and loss of sympathetic preganglionic neurons in TrkA-deficient, but not TrkB-deficient, mice. *J. Neurosci.* **17**, 891-903.

**Schreuder,M.F., Fodor,M., van Wijk,J.A., and Delemarre-van de Waal HA** (2006). Association of birth weight with cardiovascular parameters in adult rats during baseline and stressed conditions. *Pediatr. Res.* **59**, 126-130.

**Schwartz,M.W.** (2001). Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* **226**, 978-981.

**Sebaai,N., Lesage,J., Alaoui,A., Dupouy,J.P., and Deloof,S.** (2002). Effects of dehydration on endocrine regulation of the electrolyte and fluid balance and atrial natriuretic peptide-binding sites in perinatally malnourished adult male rats. *Eur. J. Endocrinol.* **147**, 835-848.

**Sebaai,N., Lesage,J., Breton,C., Vieau,D., and Deloof,S.** (2004). Perinatal food deprivation induces marked alterations of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in 8-month-old male rats both under basal conditions and after a dehydration period. *Neuroendocrinology* **79**, 163-173.

- Sebaai,N., Lesage,J., Vieau,D., Alaoui,A., Dupouy,J.P., and Deloof,S.** (2002). Altered control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in adult male rats exposed perinatally to food deprivation and/or dehydration. *Neuroendocrinology* **76**, 243-253.
- Seckl,J.R.** (2001). Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol. Cell Endocrinol.* **185**, 61-71.
- Seckl,J.R. and Holmes,M.C.** (2007). Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab* **3**, 479-488.
- Seckl,J.R. and Meaney,M.J.** (2006). Glucocorticoid "programming" and PTSD risk. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1071**, 351-378.
- Seidell,J.C.** (1997). Time trends in obesity: an epidemiological perspective. *Horm. Metab Res.* **29**, 155-158.
- Seidl,K. and Unsicker,K.** (1989a). Survival and neuritic growth of sympathoadrenal (chromaffin) precursor cells in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.* **7**, 465-473.
- Seidl,K. and Unsicker,K.** (1989b). The determination of the adrenal medullary cell fate during embryogenesis. *Dev. Biol.* **136**, 481-490.
- Seidler,F.J., Bell,J.M., and Slotkin,T.A.** (1990). Undernutrition and overnutrition in the neonatal rat: long-term effects on noradrenergic pathways in brain regions. *Pediatr. Res.* **27**, 191-197.
- Sela-Donenfeld,D. and Kalcheim,C.** (1999). Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* **126**, 4749-4762.
- Serck-Hanssen,G. and Sovik,O.** (1987). Specific insulin binding in bovine chromaffin cells; demonstration of preferential binding to adrenalin-storing cells. *Life Sci.* **41**, 2799-2806.
- Shankar,E., Santhosh,K.T., and Paulose,C.S.** (2006). Dopaminergic regulation of glucose-induced insulin secretion through dopamine D2 receptors in the pancreatic islets in vitro. *IUBMB. Life* **58**, 157-163.
- Shen,Y., Mani,S., Donovan,S.L., Schwob,J.E., and Meiri,K.F.** (2002). Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J. Neurosci.* **22**, 239-247.
- Sicard,F., Krug,A.W., Ziegler,C.G., Sperber,S., Ehrhart-Bornstein,M., and Bornstein,S.R.** (2006). Role of DHEA and growth factors in chromaffin cell proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1073**, 312-316.
- Sihag,R.K., Inagaki,M., Yamaguchi,T., Shea,T.B., and Pant,H.C.** (2007). Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp. Cell Res.* **313**, 2098-2109.
- Silacci,P., Mazzolai,L., Gauci,C., Stergiopoulos,N., Yin,H.L., and Hayoz,D.** (2004). Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2614-2623.

- Simmons,R.A., Flozak,A.S., and Ogata,E.S.** (1993). The effect of insulin and insulin-like growth factor-I on glucose transport in normal and small for gestational age fetal rats. *Endocrinology* **133**, 1361-1368.
- Simmons,R.A., Templeton,L.J., and Gertz,S.J.** (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* **50**, 2279-2286.
- Sinclair,S.K., Lea,R.G., Rees,W.D., and Young,L.E.** (2007). The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl* **64**, 425-443.
- Singer,S.R.** (2004). *Biologie du développement*. De Boek University.
- Sjogren,K., Liu,J.L., Blad,K., Skrtic,S., Vidal,O., Wallenius,V., LeRoith,D., Tornell,J., Isaksson,O.G., Jansson,J.O. et al.** (1999). Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 7088-7092.
- Skott,O. and Jensen,B.L.** (1993). Cellular and intrarenal control of renin secretion. *Clin. Sci. (Lond)* **84**, 1-10.
- Slieker,L.J., Sloop,K.W., Surface,P.L., Kriauciunas,A., LaQuier,F., Manetta,J., Bue-Valleskey,J., and Stephens,T.W.** (1996). Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J. Biol. Chem.* **271**, 5301-5304.
- Slotkin,T.A., Lau,C., and Seidler,F.J.** (1994). Beta-adrenergic receptor overexpression in the fetal rat: distribution, receptor subtypes, and coupling to adenylate cyclase activity via G-proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **129**, 223-234.
- Soderstrom,S., Bengtsson,H., and Ebendal,T.** (1996). Expression of serine/threonine kinase receptors including the bone morphogenetic factor type II receptor in the developing and adult rat brain. *Cell Tissue Res.* **286**, 269-279.
- Souza-Mello,V., Mandarim-de-Lacerda,C.A., and Aguila,M.B.** (2007). Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet. *Br. J. Nutr.* 1-11.
- St Clair,D., Xu,M., Wang,P., Yu,Y., Fang,Y., Zhang,F., Zheng,X., Gu,N., Feng,G., Sham,P. et al.** (2005). Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961. *JAMA* **294**, 557-562.
- Stachowiak,M.K., Goc,A., Hong,J.S., Poisner,A., Jiang,H.K., and Stachowiak,E.K.** (1994). Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in depolarized non-transformed bovine adrenal medullary cells: second messenger systems and promoter mechanisms. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **22**, 309-319.
- Ste Marie,L. and Palmiter,R.D.** (2003). Norepinephrine and epinephrine-deficient mice are hyperinsulinemic and have lower blood glucose. *Endocrinology* **144**, 4427-4432.

**Stein,R., Orit,S., and Anderson,D.J.** (1988). The induction of a neural-specific gene, SCG10, by nerve growth factor in PC12 cells is transcriptional, protein synthesis dependent, and glucocorticoid inhibitable. *Dev. Biol.* **127**, 316-325.

**Stettler,N., Stallings,V.A., Troxel,A.B., Zhao,J., Schinnar,R., Nelson,S.E., Ziegler,E.E., and Strom,B.L.** (2005). Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula. *Circulation* **111**, 1897-1903.

**Steventon,B., Carmona-Fontaine,C., and Mayor,R.** (2005). Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 647-654.

**Sugden,M.C. and Holness,M.J.** (2002). Gender-specific programming of insulin secretion and action. *J. Endocrinol.* **175**, 757-767.

**Sugiyama,N., Kanba,S., and Arita,J.** (2003). Temporal changes in the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the developing rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **115**, 69-77.

**Sun,M.K.** (1995). Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. *Prog. Neurobiol.* **47**, 157-233.

**Susin,S.A., Daugas,E., Ravagnan,L., Samejima,K., Zamzami,N., Loeffler,M., Costantini,P., Ferri,K.F., Irinopoulou,T., Prevost,M.C. et al.** (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* **192**, 571-580.

## T

**Tabarin,A., Chen,D., Hakanson,R., and Sundler,F.** (1994). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the adrenal gland of mammals: distribution, characterization and responses to drugs. *Neuroendocrinology* **59**, 113-119.

**Taborsky,G.J., Jr., Ahren,B., and Havel,P.J.** (1998). Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia: implications for impaired alpha-cell responses in type 1 diabetes. *Diabetes* **47**, 995-1005.

**Takahashi,M., Matsukawa,K., Nakamoto,T., Tsuchimochi,H., Sakaguchi,A., Kawaguchi,K., and Onari,K.** (2007). Control of heart rate variability by cardiac parasympathetic nerve activity during voluntary static exercise in humans with tetraplegia. *J. Appl. Physiol.*

**Takekoshi,K.** (2005). [Recent progress of catecholamines--mainly focusing on metabolic syndrome]. *Rinsho Byori* **53**, 927-934.

**Tansey,J.T., Sztalryd,C., Hlavin,E.M., Kimmel,A.R., and Londos,C.** (2004). The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB. Life* **56**, 379-385.

**Tappy,L.** (2006). Adiposity in children born small for gestational age. *Int. J. Obes. (Lond)* **30 Suppl 4**, S36-S40.

**Teillet,M.A. and Le Douarin,N.M.** (1983). Consequences of neural tube and notochord excision on the development of the peripheral nervous system in the chick embryo. *Dev. Biol.* **98**, 192-211.

- Terenghi,G., Polak,J.M., Varndell,I.M., Lee,Y.C., Wharton,J., and Bloom,S.R.** (1983). Neurotensin-like immunoreactivity in a subpopulation of noradrenaline-containing cells of the cat adrenal gland. *Endocrinology* **112**, 226-233.
- Testaz,S., Jarov,A., Williams,K.P., Ling,L.E., Koteliansky,V.E., Fournier-Thibault,C., and Duband,J.L.** (2001). Sonic hedgehog restricts adhesion and migration of neural crest cells independently of the Patched- Smoothed-Gli signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 12521-12526.
- Tezuka,M., Irahara,M., Ogura,K., Kiyokawa,M., Tamura,T., Matsuzaki,T., Yasui,T., and Aono,T.** (2002). Effects of leptin on gonadotropin secretion in juvenile female rat pituitary cells. *Eur. J. Endocrinol.* **146**, 261-266.
- Thissen,J.P., Ketelslegers,J.M., and Underwood,L.E.** (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* **15**, 80-101.
- Tischler,A.S., Powers,J.F., Downing,J.C., Riseberg,J.C., Shahsavari,M., Ziar,J., and McClain,R.M.** (1996). Vitamin D3, lactose, and xylitol stimulate chromaffin cell proliferation in the rat adrenal medulla. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **140**, 115-123.
- Tischler,A.S., Riseberg,J.C., and Gray,R.** (1995). Mitogenic and antimitogenic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in adult rat chromaffin cell cultures. *Neurosci. Lett.* **189**, 135-138.
- Tischler,A.S., Ruzicka,L.A., Donahue,S.R., and DeLellis,R.A.** (1989). Chromaffin cell proliferation in the adult rat adrenal medulla. *Int. J. Dev. Neurosci.* **7**, 439-448.
- Tomlinson,A. and Coupland,R.E.** (1990). The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *J. Anat.* **169**, 209-236.
- Tran,M.A., mase-Michel,C., Tavernier,G., Giraud,P., Montastruc,J.L., and Montastruc,P.** (1993). [Co-release of neuropeptides and catecholamines by adrenal medulla]. *Arch. Mal Coeur Vaiss.* **86**, 1253-1256.
- Trautman,P.D., Meyer-Bahlburg,H.F., Postelnek,J., and New,M.I.** (1995). Effects of early prenatal dexaméthasone on the cognitive and behavioral development of young children: results of a pilot study. *Psychoneuroendocrinology* **20**, 439-449.
- Trayhurn,P., Duncan,J.S., Hoggard,N., and Rayner,D.V.** (1998). Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc. Nutr. Soc.* **57**, 413-419.
- Treiber,F.A., Turner,J.R., Davis,H., Thompson,W., Levy,M., and Strong,W.B.** (1996). Young children's cardiovascular stress responses predict resting cardiovascular functioning 2 1/2 years later. *J. Cardiovasc. Risk* **3**, 95-100.
- Trevenzoli,I.H., Valle,M.M., Machado,F.B., Garcia,R.M., Passos,M.C., Lisboa,P.C., and Moura,E.G.** (2007). Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J. Physiol* **580**, 629-637.

**Trupp,M., Ryden,M., Jornvall,H., Funakoshi,H., Timmusk,T., Arenas,E., and Ibanez,C.F.** (1995). Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J. Cell Biol.* **130**, 137-148.

## U

**Unsicker,K.** (1993). The chromaffin cell: paradigm in cell, developmental and growth factor biology. *J. Anat.* **183** ( Pt 2), 207-221.

**Unsicker,K., Finotto,S., and Krieglstein,K.** (1997). Generation of cell diversity in the peripheral autonomic nervous system: the sympathoadrenal cell lineage revisited. *Ann. Anat.* **179**, 495-500.

**Unsicker,K., Krisch,B., Otten,U., and Thoenen,H.** (1978). Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**, 3498-3502.

## V

**Valarche,I., Tissier-Seta,J.P., Hirsch,M.R., Martinez,S., Goridis,C., and Brunet,J.F.** (1993). The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype. *Development* **119**, 881-896.

**Van de Water,W.B., Tijdens,I.B., Verbrugge,A., Huigsloot,M., Dihal,A.A., Stevens,J.L., Jaken,S., and Mulder,G.J.** (2000). Cleavage of the actin-capping protein alpha -adducin at Asp-Asp-Ser-Asp633-Ala by caspase-3 is preceded by its phosphorylation on serine 726 in cisplatin-induced apoptosis of renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 25805-25813.

**Van Dijk,D.G.** (2001). The role of leptin in the regulation of energy balance and adiposity. *J. Neuroendocrinol.* **13**, 913-921.

**Vane,L.A., Prough,D.S., Kinsky,M.A., Williams,C.A., Grady,J.J., and Kramer,G.C.** (2004). Effects of different catecholamines on the dynamics of volume expansion of crystalloid infusion. *Anesthesiology* **101**, 1136-1144.

**Vaudry,D., Gonzalez,B.J., Basille,M., Pamantung,T.F., Fontaine,M., Fournier,A., and Vaudry,H.** (2000). The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/ CPP32. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 13390-13395.

**Vaudry,D., Gonzalez,B.J., Basille,M., Yon,L., Fournier,A., and Vaudry,H.** (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* **52**, 269-324.

**Vaudry,D. and Taupenot,L.** (2002). Fast-breaking results on the PACAP/VIP/secretin peptide family in chromaffin cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **971**, 460-466.

**Verrey,F., Groscurth,P., and Bolliger,U.** (1995). Cytoskeletal disruption in A6 kidney cells: impact on endo/exocytosis and NaCl transport regulation by antidiuretic hormone. *J. Membr. Biol.* **145**, 193-204.

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

**Vickers,M.H., Ikenasio,B.A., and Breier,B.H.** (2001). IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. *Endocrinology* **142**, 3964-3973.

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

**Vogel,K.S. and Weston,J.A.** (1990a). The sympathoadrenal lineage in avian embryos. II. Effects of glucocorticoids on cultured neural crest cells. *Dev. Biol.* **139**, 13-23.

**Vogel,K.S. and Weston,J.A.** (1990b). The sympathoadrenal lineage in avian embryos. I. Adrenal chromaffin cells lose neuronal traits during embryogenesis. *Dev. Biol.* **139**, 1-12.

## W

**Wadden,T.A.** (1983). Predicting treatment response to relaxation therapy for essential hypertension. *J. Nerv. Ment. Dis.* **171**, 683-689.

**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.

**Wakade,A.R., Wakade,T.D., Malhotra,R.K., and Bhave,S.V.** (1988). Excess K<sup>+</sup> and phorbol ester activate protein kinase C and support the survival of chick sympathetic neurons in culture. *J. Neurochem.* **51**, 975-983.

**Wakade,A.R., Wakade,T.D., Poosch,M., and Bannon,M.J.** (1996). Noradrenaline transport and transporter mRNA of rat chromaffin cells are controlled by dexaméthasone and nerve growth factor. *J. Physiol* **494 ( Pt 1)**, 67-75.

**Walker,B.R.** (2006). Cortisol--cause and cure for metabolic syndrome? *Diabet. Med.* **23**, 1281-1288.

**Wan,D.C., Choi,C.L., and Livett,B.G.** (1989a). Developmental expression of proenkephalin A mRNA and phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA in foetal sheep adrenal medulla. *Int. J. Dev. Neurosci.* **7**, 489-498.

**Wan,D.C., Marley,P.D., and Livett,B.G.** (1991). Coordinate and differential regulation of proenkephalin A and PNMT mRNA expression in cultured bovine adrenal chromaffin cells: responses to secretory stimuli. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **9**, 103-111.

- Wan,D.C., Scanlon,D., Choi,C.L., Bunn,S.J., Howe,P.R., and Livett,B.G.** (1989b). Co-localization of RNAs coding for phenylethanolamine N-methyltransferase and proenkephalin A in bovine and ovine adrenals. *J. Auton. Nerv. Syst.* **26**, 231-240.
- Wang,G., Qi,C., Fan,G.H., Zhou,H.Y., and Chen,S.D.** (2005). PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett.* **579**, 4005-4011.
- Ward,A.M., Moore,V.M., Steptoe,A., Cockington,R.A., Robinson,J.S., and Phillips,D.I.** (2004). Size at birth and cardiovascular responses to psychological stressors: evidence for prenatal programming in women. *J. Hypertens.* **22**, 2295-2301.
- Watanabe,T., Masuo,Y., Matsumoto,H., Suzuki,N., Ohtaki,T., Masuda,Y., Kitada,C., Tsuda,M., and Fujino,M.** (1992). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide provokes cultured rat chromaffin cells to secrete adrenaline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 403-411.
- Watt,M.J. and Hargreaves,M.** (2002). Effect of epinephrine on glucose disposal during exercise in humans: role of muscle glycogen. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **283**, E578-E583.
- Watt,M.J., Howlett,K.F., Febbraio,M.A., Spriet,L.L., and Hargreaves,M.** (2001). Adrenaline increases skeletal muscle glycogenolysis, pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. *J. Physiol* **534**, 269-278.
- Weaver,I.C., Cervoni,N., Champagne,F.A., D'Alessio,A.C., Sharma,S., Seckl,J.R., Dymov,S., Szyf,M., and Meaney,M.J.** (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* **7**, 847-854.
- Westberg,J.A., Zhang,K.Z., and Andersson,L.C.** (1999). Regulation of neural differentiation by normal and mutant (G654A, amyloidogenic) gelsolin. *FASEB J.* **13**, 1621-1626.
- Widimsky,J., Jr., Zelinka,T., Petrak,O., Strauch,B., Safarik,L., Kasalicky,M., Vrankova,A., and Holaj,R.** (2007). [Diagnostic and therapeutic procedures in pheochromocytoma: current trends]. *Vnitr. Lek.* **53**, 428-433.
- Wiggins,R.C., Fuller,G., and Enna,S.J.** (1984). Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. *Life Sci.* **35**, 2085-2094.
- Wikstrom,L.M., Meister,B., Franck,J., and Fried,G.** (1996). Changes in enkephalin and neuropeptide Y-like immunoreactivity in rabbit chromaffin tissues during perinatal development. *Regul. Pept.* **61**, 37-44.
- Wild,S., Roglic,G., Green,A., Sicree,R., and King,H.** (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 1047-1053.
- Wilson,S.P.** (1991). Insulin-like growth factor I enhances proenkephalin synthesis and dopamine beta-hydroxylase activity in adrenal chromaffin cells. *Life Sci.* **49**, 269-272.
- Wolf,G.** (2003). Adult type 2 diabetes induced by intrauterine growth retardation. *Nutr. Rev.* **61**, 176-179.

**Wolf,N. and Krieglstein,K.** (1995). Phenotypic development of neonatal rat chromaffin cells in response to adrenal growth factors and glucocorticoids: focus on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Neurosci. Lett.* **200**, 207-210.

**Woods,L.L.** (2006). Maternal glucocorticoids and prenatal programming of hypertension. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **291**, R1069-R1075.

**Woods,L.L. and Weeks,D.A.** (2005). Prenatal programming of adult blood pressure: role of maternal corticosteroids. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **289**, R955-R962.

**Woods,L.L., Weeks,D.A., and Rasch,R.** (2004). Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int.* **65**, 1339-1348.

**Woods,S.C. and Seeley,R.J.** (2000). Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* **16**, 894-902.

**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. *Obes. Rev.* **7**, 201-208.

**Wurtman,R.J., Axelrod,J., Vesell,E.S., and Ross,G.T.** (1968). Species differences in inducibility of phenylethanolamine-N-methyl transferase. *Endocrinology* **82**, 584-590.

## X

**Xu,J. and Desir,G.V.** (2007). Renalase, a new renal hormone: its role in health and disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **16**, 373-378.

**Xu,J., Tang,K.S., Lu,V.B., Weerasinghe,C.P., Tse,A., and Tse,F.W.** (2005). Maintenance of quantal size and immediately releasable granules in rat chromaffin cells by glucocorticoid. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **289**, C1122-C1133.

## Y

**Yajnik,C.S.** (2004). Early life origins of insulin resistance and type 2 diabetes in India and other Asian countries. *J. Nutr.* **134**, 205-210.

**Yamazaki,S., Katada,T., and Ui,M.** (1982). Alpha 2-adrenergic inhibition of insulin secretion via interference with cyclic AMP generation in rat pancreatic islets. *Mol. Pharmacol.* **21**, 648-653.

**Yanase,T., Nawata,H., Higuchi,K., Kato,K., and Ibayashi,H.** (1984). Dexaméthasone increases both catecholamines and methionine-enkephalin in cultured bovine adrenal chromaffin cells and human extramedullary pheochromocytoma cells. *Life Sci.* **35**, 1869-1875.

**Yon,L., Breault,L., Contesse,V., Bellancourt,G., Delarue,C., Fournier,A., Lehoux,J.G., Gallo-Payet,N., and Vaudry,H.** (1998a). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the fetal human adrenal gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **865**, 416-419.

- Yon,L., Breault,L., Contesse,V., Bellancourt,G., Delarue,C., Fournier,A., Lehoux,J.G., Vaudry,H., and Gallo-Payet,N.** (1998b). Localization, characterization, and second messenger coupling of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the fetal human adrenal gland during the second trimester of gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 1299-1305.
- Yon,L., Montero,M., Bellancourt,G., Fournier,A., Chartrel,N., and Vaudry,H.** (1998c). Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the regulation of frog adrenal steroidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **839**, 384-385.
- Yoo,S.H.** (1995). pH- and Ca(2+)-induced conformational change and aggregation of chromogranin B. Comparison with chromogranin A and implication in secretory vesicle biogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 12578-12583.
- Yoo,S.H.** (1996). pH- and Ca(2+)-dependent aggregation property of secretory vesicle matrix proteins and the potential role of chromogranins A and B in secretory vesicle biogenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 1558-1565.
- Yoo,S.H. and Lewis,M.S.** (1996). Effects of pH and Ca<sup>2+</sup> on heterodimer and heterotetramer formation by chromogranin A and chromogranin B. *J. Biol. Chem.* **271**, 17041-17046.
- Yoo,S.H., You,S.H., and Huh,Y.H.** (2005). Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. *FEBS Lett.* **579**, 222-228.
- Young,J.B.** (2006). Developmental origins of obesity: a sympathoadrenal perspective. *Int. J. Obes. (Lond)* **30 Suppl 4**, S41-S49.
- Young,J.B.** (2002). Programming of sympathoadrenal function. *Trends Endocrinol. Metab* **13**, 381-385.
- Young,J.B.** (2000). Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **279**, R1745-R1752.
- Young,J.B. and Morrison,S.F.** (1998). Effects of fetal and neonatal environment on sympathetic nervous system development. *Diabetes Care* **21 Suppl 2**, B156-B160.
- Young,J.B. and Shimano,Y.** (1998). Effects of rearing temperature on body weight and abdominal fat in male and female rats. *Am. J. Physiol* **274**, R398-R405.
- Young,J.B., Weiss,J., and Boufath,N.** (2002). Effects of rearing temperature on sympathoadrenal activity in young adult rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **283**, R1198-R1209.
- Yu,R., Kim,C.S., Kwon,B.S., and Kawada,T.** (2006). Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. *Obesity. (Silver. Spring)* **14**, 1353-1362.
- Yu,T.W. and Bargmann,C.I.** (2001). Dynamic regulation of axon guidance. *Nat. Neurosci.* **4 Suppl**, 1169-1176.

## Z

**Zambrano,E., Bautista,C.J., Deas,M., Martinez-Samayoa,P.M., Gonzalez-Zamorano,M., Ledesma,H., Morales,J., Larrea,F., and Nathanielsz,P.W.** (2006). A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J. Physiol* **571**, 221-230.

**Zaubler,T.S. and Katon,W.** (1996). Panic disorder and medical comorbidity: a review of the medical and psychiatric literature. *Bull. Menninger Clin.* **60**, A12-A38.

**Zawalich,W.S., Zawalich,K.C., and Yamazaki,H.** (2007). Divergent effects of epinephrine and prostaglandin E2 on glucose-induced insulin secretion from perfused rat islets. *Metabolism* **56**, 12-18.

**Zelinka,T., Eisenhofer,G., and Pacak,K.** (2007). Pheochromocytoma as a catecholamine producing tumor: implications for clinical practice. *Stress.* **10**, 195-203.

**Zhang,D., Mehler,M.F., Song,Q., and Kessler,J.A.** (1998). Development of bone morphogenetic protein receptors in the nervous system and possible roles in regulating trkC expression. *J. Neurosci.* **18**, 3314-3326.

**Zhang,L.** (2005). Prenatal hypoxia and cardiac programming. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **12**, 2-13.

**Zhang,Y., Proenca,R., Maffei,M., Barone,M., Leopold,L., and Friedman,J.M.** (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432.

