



HAL
open science

Retard de croissance intra-utérin et vulnérabilité au syndrome métabolique : recherche de marqueurs placentaires dans un modèle de dénutrition maternelle prénatale et chez l'Homme

Sylvain Mayeur

► **To cite this version:**

Sylvain Mayeur. Retard de croissance intra-utérin et vulnérabilité au syndrome métabolique : recherche de marqueurs placentaires dans un modèle de dénutrition maternelle prénatale et chez l'Homme. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S040 . tel-00829097

HAL Id: tel-00829097

<https://theses.hal.science/tel-00829097>

Submitted on 2 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LILLE 2 DROIT ET SANTÉ

ÉCOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTÉ"
de Lille Nord de France

Année 2011

**Retard de croissance intra-utérin et vulnérabilité au syndrome
métabolique : recherche de marqueurs placentaires dans un
modèle de dénutrition maternelle prénatale et chez l'Homme**

THÈSE DE DOCTORAT

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Sylvain MAYEUR

Le 10 novembre 2011 devant le jury ci-dessous

Président Pr Bastide Bruno, Université de Lille Nord de France

Rapporteurs Dr Bréant Bernadette, INSERM, Paris
Dr Knauf Claude, INSERM, Toulouse

Examineurs Pr Junien Claudine, INRA, Jouy en Josas

Directeur Pr Storme Laurent, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille

Co-directeur Pr Lesage Jean, Université de Lille Nord de France

Quelques citations, qui d'après moi, retranscrivent dans cet ordre, assez fidèlement le monde de la recherche scientifique, avec ses moments d'inspiration, d'excitation, d'émerveillement et d'exultation, mais aussi ses instants d'égarement, de déception et de rage. Un panel de sentiments qui dans leur ensemble contribue à faire de la science une passion. Chacun retrouvera, je pense, dans ces citations, un peu du quotidien du chercheur.

« La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas "euréka (j'ai trouvé)" mais plutôt "tiens, c'est marrant ..." ».

Isaac Asimov

« On a souvent dit que, pour faire des découvertes, il fallait être ignorant. Cette opinion fautive en elle-même cache cependant une vérité. Elle signifie qu'il vaut mieux ne rien savoir que d'avoir dans l'esprit des idées fixes appuyées sur des théories dont on cherche toujours la confirmation en négligeant tout ce qui ne s'y rapporte pas ».

Claude Bernard, Introduction à l'étude de la médecine expérimentale

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

Albert Einstein

« En essayant continuellement on finit par réussir. Donc plus ça rate, plus on a de chances que ça marche. »

Devise Shaddock

De nombreuses données indiquent qu'un petit poids à la naissance, résultant en partie d'une sous-nutrition materno-fœtale, est associé à une augmentation de la morbidité et de la mortalité durant la période néonatale, et conduit également à un risque accru de développer à l'âge adulte un syndrome métabolique (diabète de type 2, obésité, hypertension artérielle et dyslipidémie). Les mécanismes de cette programmation prénatale sont encore mal connus et impliqueraient plusieurs molécules et systèmes physiologiques distincts. De nombreuses études suggèrent que le placenta serait impliqué dans la programmation de ces pathologies métaboliques. En effet, celui-ci constitue un organe de communication entre la mère et son fœtus et participe à la régulation de l'homéostasie fœtale. En raison de la proportion croissante de femmes présentant des troubles de la nutrition durant la grossesse et en lien avec leurs répercussions potentielles chez la descendance, il est nécessaire de mieux comprendre les interactions entre l'alimentation maternelle et l'unité fœto-placentaire et d'identifier les mécanismes impliqués dans les altérations de la croissance fœtale. En conséquence, le placenta constitue un organe de choix pour étudier les interactions entre l'alimentation maternelle et le fœtus au cours de la grossesse. Durant cette thèse, nous avons tenté d'identifier de nouvelles voies moléculaires placentaires impliquées dans le contrôle de la croissance fœtale chez le rat, puis étudié l'expression de ces facteurs dans des placentas humains provenant de grossesses impliquant des anomalies de la croissance fœtale.

Comme la malnutrition maternelle constitue une part importante dans l'étiologie du retard de croissance intra-utérin (RCIU), nous avons utilisé un modèle expérimental effectué chez le rat, qui consiste en une réduction (de 50 % à 70 %) de la ration alimentaire quotidienne maternelle durant la gestation. Ces régimes conduisent à des troubles de la croissance de l'unité fœto-placentaire révélés par des réductions drastiques du poids du placenta et des poids de naissance à terme. Afin d'identifier de nouvelles voies placentaires impliquées dans RCIU, nous avons utilisé deux méthodologies différentes : une approche protéomique et une évaluation de deux protéines récemment caractérisées.

Premièrement, nous avons étudié le protéome placentaire chez le rat RCIU provenant de mères dénutries par une analyse protéomique (2D-PAGE et spectrométrie de masse). Cette stratégie nous a permis de découvrir de nouvelles voies modulées par le RCIU et, étonnamment, des modulations importantes ont été observées pour plusieurs protéines mitochondriales, suggérant un effet ciblé de la dénutrition sur ces organites. Par la suite, en utilisant diverses techniques d'analyses moléculaires, protéomiques et fonctionnelles, nous avons montré que ces organites élaborent une réponse adaptative à la restriction alimentaire maternelle qui pourrait avoir des conséquences sur la régulation de la croissance fœtale. Deuxièmement, nous avons étudié deux autres protéines atypiques: le *brain-derived neurotrophic factor* et l'hormone apéline. Nos résultats suggèrent que ces deux facteurs pourraient être impliqués, au niveau placentaire, dans le contrôle de la croissance fœtale à la fois chez le rat et chez l'Homme.

En conclusion, comme les techniques cliniques actuelles ne permettent pas de diagnostiquer avec précision un RCIU, nos résultats pourraient permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie placentaire et permettre de développer de nouveaux marqueurs de diagnostic et/ou de traitement dans le but d'améliorer la croissance placentaire et fœtale en conditions pathologiques.

Remerciements

Comme le veut la tradition, je vais commencer par remercier les différentes personnes qui m'ont directement et indirectement aidé lors de la réalisation de ce travail de thèse. Cette tâche représente donc une partie difficile de ce manuscrit, car les mots «sincères» qui expriment ma gratitude à chaque membre du laboratoire ne sont écrits ni dans les articles ni dans les livres.

Dans un premier temps, je souhaite exprimer une profonde gratitude aux membres de ce jury de thèse pour l'attention que vous avez portée à ce travail en dépit de vos différentes charges administratives et scientifiques.

Une attention particulière aux Professeurs Laurent Storme et Jean Lesage, qu'ils reçoivent toute l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir accueilli et m'avoir permis de réaliser cette étude. Jean, je tiens à te remercier plus particulièrement pour m'avoir guidé durant ces quatre dernières années. Un grand Merci également pour m'avoir parfois recadré mais aussi fait confiance pour expérimenter certaines de mes hypothèses. J'ai vraiment apprécié ta bonne humeur, ta gentillesse, ta présence et ton soutien tant scientifique que personnel. Sache que tu as largement contribué à mon épanouissement professionnel.

Je tiens à remercier le Professeur Bruno Bastide pour m'avoir encadré et soutenu lors de mes premiers pas de chercheur durant ma dernière année de Master mais aussi pour m'avoir suivi, même si cela fut plus indirectement, lors du doctorat.

Merci au Professeur Didier Vieau pour ses conseils et pour le temps consacré pour toutes les corrections mais surtout pour nos discussions scientifiques qui ont toujours été très instructives.

Au Professeur Claudine Junien ainsi qu'au Docteur Anne Gabory, je souhaite exprimer ici toute ma gratitude. Ce fut un grand plaisir de pouvoir collaborer avec vous.

Un merci au Docteur Claude Knauf pour son aide, notamment dans la partie apéline de ce travail.

Un grand Merci au Docteur Sophie Duban-Deweer et à Johan Hachani pour leur précieuse aide lors de notre collaboration "protéomique". Vous savez créer une ambiance joviale de travail et pour cela j'ai sincèrement apprécié de travailler avec vous. Je souhaite également remercier Christophe Landry, le Professeur Yannis Karamanos, le Docteur Christophe Flahaut ainsi que l'ensemble de l'équipe du Laboratoire de Physiopathologie de la Barrière Hémato-Encéphalique de l'Université d'Artois de Lens qui m'ont fait découvrir, il y a maintenant sept ans, le monde de la recherche et m'ont donné l'envie de poursuivre mes études dans cette voie.

Pour sa collaboration efficace et précieuse et pour avoir partagé ses connaissances techniques et intellectuelles sur la bioénergétique mitochondriale, je remercie vivement le Dr Steve Lancel. Vous avez toujours été disponible pour répondre à mes interrogations. Sachez que j'admire sincèrement votre rigueur scientifique et votre sens du mot juste.

Un merci également à tous les membres du Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire pour leur accueil dans leurs locaux lors des études de protéomique mais aussi pour avoir toujours été disponible pour me conseiller lorsque j'ai pu rencontrer différents soucis techniques.

Je veux également remercier l'ensemble des membres du laboratoire et plus particulièrement Christine, Isabelle et Christophe. J'ai vraiment apprécié votre disponibilité, vos nombreux et précieux conseils scientifiques mais aussi votre entrain.

Remerciements

Pour leur disponibilité ainsi que pour leur aide, leur gentillesse et leur gaieté, Valérie, Anne, Capucine, Geoffrey et Estelle. Merci !

Pour reprendre les termes du "fraichement" formé Docteur Delahaye "ma vie au labo n'aurait pu être ce qu'elle a été sans mes chers confrères", je te retourne donc avec Ouma et JS, ce compliment. J'ai vraiment apprécié de travailler avec vous mais aussi de partager ensemble quelques petits moments de détente. Je vous souhaite bon courage ainsi que beaucoup de réussite pour le futur.

Un clin d'œil aux différents étudiants que j'ai pu côtoyer dans la partie du laboratoire situé au sein du "Pôle recherche de Lille 2". Laura, sache que j'ai vraiment apprécié ta bonne humeur, ce fut un plaisir de "manipuler" avec toi et je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite de ta thèse et de ta carrière professionnelle.

Sensible à l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à mon travail, je souhaite également remercier les différents enseignants que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant mon monitorat.

Une attention particulière pour Cyrille, avec qui j'ai été heureux de travailler durant mon master. Tu as su me donner de nombreux conseils qui ont et qui seront fortement précieux pour le futur.

Enfin, je remercie ceux qui m'ont soutenu en dehors du labo, ceux qui savent dire les mots qu'il faut au moment où il faut, ceux qui m'ont toujours soutenu et qui ont "subi" mes péripéties scientifiques.

Une pensée à mes amis : Julien, Duidui, Kins. On dit que le monde de la recherche impose souvent des sacrifices. Je ne peux donc que regretter que la distance géographique mais surtout le manque de temps, nous ait un peu éloigné.

Un énorme merci à mes amis de la "team croquette", pour tous ces moments partagés ensemble. C'est toujours une grande joie de vous retrouver !

Si j'ai pu réaliser cette thèse, c'est en grande partie grâce à Emeric ou plutôt Mr Delong, qui m'a encouragé à poursuivre mes études alors que je m'étais destiné à une carrière plus technique. Merci de m'avoir inculqué quelques unes de tes très nombreuses passions.

Une pensée pour Sophie qui malgré l'éloignement géographique a toujours su rester proche.

Un coucou "aux poilus" qui m'ont à leurs façons soutenus durant ces dernières années.

Merci également à mes beaux-parents pour m'avoir soutenu tant au niveau culinaire que moral.

À mes parents et à ma grand-mère qui m'ont élevé avec amour et attention, dans le respect et le partage et inculqué des valeurs morales comme l'abnégation et la volonté. Ce travail correspond à l'aboutissement d'une partie de leur éducation. Je suis extrêmement fier de les remercier pour tout cela.

Marie-Amélie, tu es beaucoup plus qu'un pilier central dans cette thèse. Compagne de vie mais aussi de travail, nous avons donc vécu presque en direct nos expériences et résultats. Ton soutien et tes nombreuses attentions m'ont souvent donné l'énergie nécessaire pour mener à bien ce projet. Merci d'être tout simplement présente à chaque instant, pour tout le bonheur que tu m'apportes et pour tout ce que nous partageons. Comme nous nous le disons souvent, seul un autre scientifique peut comprendre pleinement ce que représente les incertitudes du monde de la recherche. Je t'aime.

- **Articles originaux** (* : contribution égale)

Mayeur S., Silhol M., Moitrot E., Barbaux S., Breton C., Gabory A., Vaiman D., Dutriez-Casteloot I., Fajardy I., Vambergue A., Tapia-Arancibia L., Bastide B., Storme L., Junien C., Vieau D., Lesage J. *Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human.* Placenta, 2010, 31: 785-791.

Gallou-Kabani C., Gabory A., Tost J., Karimi M., **Mayeur S.**, Boudadi E., Gross M.S., Taurelle J., Vigé A., Lesage J., Reusens B., Remacle C., Vieau D., Ekstrom T.J., Jais J.P., Junien C. *Sex- and diet-specific dysregulation of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high fat diet.* PLOS One, 2010, 5: e14398.

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

Lukaszewski M.A., **Mayeur S.**, Fajardy I., Delahaye F., Dutriez-Casteloot I., Montel V., Dickes-Coopman A., Laborie C., Lesage J., Vieau D., Breton C. *Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male under high-fat diet.* Am J Physiol Endocrinol Metab., 2011, 301: 548-559.

Mayeur S.*, Gabory A.*, Barbaux S., Gothie J.D., Vaiman D., Vambergue A., Deruelle P., Moitrot E., Fajardy I., Storme L., Junien C., Vieau D., Lesage J. *Placental FTO expression is reduced by maternal diabetes and fetal growth restriction associated with vascular disturbances.* (en préparation).

Gabory A., Gothié J.D., Fajardy I., Ferry L., Vigé A., Fleur C., **Mayeur S.**, Gallou-Kabani C., Gross M.S., Jouneau L., Vambergue A., Lesage J., Reusens B., Vieau D., Remacle C., Jais J.P., Junien C. *Female- and male-specific transcriptomic and epigenetic placental signatures in response to a maternal high-fat diet in mice.* (en préparation).

Mayeur S., Lancel S., Theys N., Lukaszewski M.A., Duban-Deweere S., Bastide B., Hachani J., Cecchelli R., Breton C., Gabory A., Storme L., Reusens B., Junien C., Vieau D., Lesage J. *Maternal undernutrition upregulates mitochondrial biogenesis and optimizes ATP production efficiency: putative involvement in fetal growth restriction etiology.* (en préparation).

- **Revues**

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

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

- **Chapitre de livre**

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

- **Résumé publié**

Butruille L., Caputo M., Lesage J., **Mayeur S.**, Storme L., Deruelle P. P.192: *Effects de l'inhibition de la voie Rho Kinases par le Fasudil sur la croissance et les paramètres métaboliques après retard de croissance intra-utérin.* *Diabetes Metab.*, 2011, 37 (Suppl. 1): A79.

- **Communications orales**

Mayeur S., Lancel S., Duban-Deewer S., Bastide B., Junien C., Cécchelli R., Nevière R., Storme L., Vieau D., Lesage J. *Research of placental markers of intrauterine growth restriction by proteomic analysis in the rat : Focus on mitochondria.* 10^{ème} journée André Verbert de l'École Doctorale Biologie-Santé de Lille – Lille – 15 septembre 2010.

Mayeur S., Lancel S., Lukaszewski M.A., Duban-Deewer S., Bastide B., Hachani J., Nevière R., Storme L., Breton C., Junien C., Vieau D., Lesage J. *Research of potential placental markers of intra-uterine growth retardation by proteomic analysis in rat.* 9^{ème} journée francophone de recherche en obstétrique et gynécologie – Paris – 9 décembre 2010.

- **Communications affichées**

Mayeur S., Dutriez-Casteloot I., Moitrot E., Breton C., Silhol M., Fajardy I., Vambergue A., Storme L., Bastide B., Tapia-Arancibia L., Junien C., Vieau D., Lesage J. *Demonstration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in rodent and human placenta : modulation in IUGR rats.* IUGR and metabolic programming – Beauvais – 23 mars 2009.

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

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

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

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

Mayeur S., Silhol M., Moitrot E., Barbaux S., Breton C., Gabory A., Vaiman D., Dutriez-Casteloot I., Fajardy I., Vambergue A., Tapia-Arancibia L., Bastide B., Storme L., Junien C., Vieau D., Lesage J. *Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human.* 14^{ème} journée LARC Neurosciences – Lille – 29 octobre 2010.

Lukaszewski M.A., Delahaye F., **Mayeur S.**, Fajardy I., Dutriez-Casteloot I., Montel V., Dickes-Coopman A., Laborie C., Lesage J., Vieau D., Storme L., Breton C. *Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue and hypothalamus gene expression in adult male rat offspring on a high-fat diet.* 14^{ème} journée LARC Neurosciences - Lille - 29 octobre 2010.

Gabory A., Gallou-Kabani C, Tost J., Karimi M., **Mayeur S.**, Lesage J., Boudadi E., Gross M.S., Breton C., Reusens B., Remacle C., Vieau D., Ekström T.J., Jais J.P., Junien C. *Sex and diet dictate the metabolic syndrome epigenetic programming in the placenta.* 4th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics - Pamplone, Espagne - 17 au 20 novembre 2010.

Butruille L., Caputo M., Lesage J., **Mayeur S.**, Storme L., Deruelle P. *Effects of Rho kinase pathway inhibition by Fasudil on growth and metabolic parameters in a rat model of intrauterine growth retardation.* Congrès de la Société Francophone du Diabète 2011 - Genève, Suisse - 22 au 25 mars 2011.

- **Prix**

Récipiendaire du prix de la meilleure communication orale - 10^{ème} journée André Verbert de l'École Doctorale Biologie-Santé de Lille – Lille – 15 septembre 2010.

Récipiendaire du prix spécial du jury 2011 de l'Institut Appert pour le projet postdoctoral : "Étude de l'implication des dysfonctions mitochondriales dans le développement du diabète de type 2" développé avec le Dr Jennifer Estall de Montréal.

Des perturbations de la croissance fœtale à la programmation des pathologies chez l'adulte.	- 19 -
I. Adaptations physiologiques durant la grossesse	- 21 -
a) <i>Fécondation, croissance embryonnaire et croissance fœtale</i>	- 21 -
b) <i>Modifications maternelles liées à la grossesse</i>	- 22 -
II. Croissance fœtale et régulations	- 29 -
a) <i>Influence des parents</i>	- 29 -
b) <i>Le placenta</i>	- 33 -
c) <i>Influence épigénétique et empreinte parentale</i>	- 36 -
d) <i>Régulations endocrines</i>	- 39 -
III. Les altérations de la croissance fœtale	- 43 -
a) <i>Petit poids de naissance et RCIU : définition et épidémiologie</i>	- 43 -
b) <i>Diagnostic du RCIU</i>	- 46 -
c) <i>Prise en charge du RCIU</i>	- 48 -
d) <i>Étiologie du RCIU</i>	- 51 -
e) <i>Conséquences à court terme du RCIU</i>	- 55 -
f) <i>Conséquences à long terme du RCIU</i>	- 57 -
g) <i>Mécanismes intervenant dans la programmation fœtale</i>	- 61 -
IV. Les modèles nutritionnels utilisés dans l'étude du RCIU et de la programmation fœtale.	- 63 -
a) <i>Dénutrition et famine : données épidémiologiques</i>	- 63 -
b) <i>Impact de la dénutrition sur le développement fœto-placentaire</i>	- 65 -
c) <i>Autres modèles d'altération nutritionnelle</i>	- 66 -
Partie 1 : Recherche par analyse protéomique de protéines impliquées dans le RCIU	- 69 -
I. Objectif	- 72 -
II. Discussion	- 99 -
a) <i>Impact de la dénutrition maternelle sur le protéome placentaire du rat FR30 à terme</i> ... -	99 -
b) <i>Impact de la restriction calorique maternelle sur le fonctionnement mitochondrial</i>	- 104 -
Partie 2 : Recherche par une approche ciblée de facteurs impliqués dans la croissance fœtale	- 111 -
Partie 2.1 : Placental BDNF/TrkB Signaling System is Modulated by Fetal Growth disturbances in Rat and Human	- 115 -
I. BDNF et ses récepteurs	- 117 -
a) <i>Description et biosynthèse</i>	- 117 -
b) <i>Distribution tissulaire</i>	- 119 -
c) <i>Régulation de l'activité du BDNF</i>	- 119 -

d) Fonction Physiologique du BDNF	- 121 -
e) Pourquoi étudier le BDNF placentaire dans notre modèle de RCIU ?	- 123 -
f) Objectifs.....	- 124 -
II. Discussion	- 133 -
a) La localisation de cette neurotrophine nous permet-elle de déterminer sa fonction ?... -	133 -
b) Le couple BDNF/TrkB contribue-t-il à la croissance fœtale ?.....	- 135 -
Partie 2.2 : Étude du système apélinergique durant la gestation chez le rat et l'Homme : focus sur son éventuelle implication sur la croissance fœtale.....	- 143 -
I. Le système apélinergique	- 145 -
a) Description et biosynthèse	- 145 -
b) Distribution tissulaire.....	- 147 -
c) Fonction physiologique du système apélinergique.....	- 149 -
d) Pourquoi étudier le couple apéline/APJ durant la gestation ?	- 155 -
e) Objectifs.....	- 156 -
II. Matériels & Méthodes	- 157 -
a) Ontogénèse sur le modèle FR30.....	- 157 -
b) Sacrifices et prélèvements de tissus.....	- 159 -
c) RT-PCR quantitative.....	- 159 -
d) Dosage de l'apéline plasmatique par ELISA.....	- 160 -
e) Hybridation in situ.....	- 160 -
f) Étude de l'expression placentaire du système apélinergique chez l'Homme	- 160 -
g) Analyses statistiques	- 161 -
III. Résultats.....	- 163 -
a) Quelles sont les conséquences de la dénutrition maternelle de 70 % sur la croissance placentaire et fœtale ?	- 163 -
b) Quel est l'impact de la gestation et du modèle FR30 sur le système apélinergique ?	- 167 -
c) L'expression placentaire du système apélinergique est-elle modulée chez l'Homme dans des pathologies associées à des croissances fœtales altérées ?.....	- 171 -
IV. Discussion.....	- 173 -
a) Quel est le rôle du système apéline/APJ dans la gestation et la croissance fœtale ?.....	- 173 -
Perspectives d'effets programmeurs sur le long terme.....	- 177 -
a) Impacts des mitochondries dans la programmation fœtale ?.....	- 179 -
b) BDNF/TrkB et le concept de programmation fœtale.....	- 181 -
Conclusion.....	- 185 -
Références	- 189 -

11β-HSD2	11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2
AA	Acide aminé
ACE2	<i>Angiotensin-converting enzyme 2</i>
ADNmt	ADN mitochondrial
ANT	<i>Adenine nucleotide translocase</i>
APJ	Récepteur de l'apéline
AVP	Vasopressine
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
Cryab	<i>α-crystallin β chain</i>
Dnmt	<i>Dna methyltransferase</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric-oxide synthase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GLUT	Transporteur passif du glucose
GR	Récepteur aux glucocorticoïde de type 2
HCG	Hormone gonadotrophine chorionique
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
ICV	Injection intracérébroventriculaire
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IMC	Indice de masse corporelle
MMP	Métalloprotéinase matricielle
NRF-1	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
p75^{NTR}	<i>p75 neurotrophin receptor</i>
Pdx-1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>

PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1α</i>
PGC-1β	<i>Peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1β</i>
Ppia	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>
Psmb2	<i>Proteasome subunit β type-2</i>
pGlu	Pyroglutamate
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
ROS	Espèces réactives oxygénées
TFAM	<i>Transcription factor A mitochondrial</i>
TrkB	" <i>Tropomyosin related kinase</i> " de type B
TrkB-FL	TrkB de forme longue
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	Récepteur au VEGF

- Tableau 1 :** Répartition de la prise de poids durant la grossesse
- Tableau 2 :** Prise de poids recommandée au cours de la grossesse en fonction de la corpulence de la mère à la conception
- Tableau 3 :** Classification de la morphologie placentaire
- Tableau 4 :** Incidence du statut nutritionnel maternel sur le développement du RCIU
- Tableau 5 :** Conséquences à long terme de la famine d'Amsterdam
- Tableau 6 :** Distribution tissulaire de l'ARNm de l'apéline et APJ chez le rat, la souris et l'Homme
- Tableau 7 :** Paramètres des amorces utilisées pour la qRT-PCR
- Tableau 8 :** Ontogenèse des paramètres materno-fœtaux dans le modèle FR30
- Tableau 9 :** Paramètres maternels et fœtaux
-
- Figure 1 :** Représentation des interactions entre la mère, le fœtus et le placenta sur la croissance fœtale durant la grossesse humaine
- Figure 2 :** Représentation schématique de l'expérience de Walton et Hammond
- Figure 3 :** Représentation des différents types de barrière placentaire d'après leurs compositions cellulaires
- Figure 4 :** Représentation schématique du placenta humain montrant l'organisation de la vascularisation fœto-placentaire
- Figure 5 :** Représentations comparatives schématiques simplifiées du placenta chez l'Homme et le rongeur montrant l'organisation de la vascularisation fœto-placentaire
- Figure 6 :** Représentation schématique de la définition du petit poids de naissance
- Figure 7 :** Distribution géographique du RCIU
- Figure 8 :** Représentation schématique des différents facteurs et altérations aboutissant à un RCIU et leurs conséquences à court et long terme
- Figure 9 :** Taux de décès par pathologies cardiovasculaires en fonction de l'IMC à la naissance à terme chez l'homme
- Figure 10 :** Diagramme en boîte à moustache représentant la distribution de l'IMC chez des hommes de plus de 40 ans en fonction de leur poids de naissance
- Figure 11 :** Impact d'un RCIU sur le développement du syndrome métabolique
- Figure 12 :** Représentation schématique de la structure d'un protéasome et de sa fonction.

- Figure 13 :** Représentation schématique de la production d'ATP et de ROS par les mitochondries.
- Figure 14 :** Représentation schématique des interactions du pro-BDNF/BDNF avec ses récepteurs chez le rongeur
- Figure 15 :** Distribution tissulaire du BDNF et de ses récepteurs chez le rat
- Figure 16 :** Représentation schématique de l'invasion trophoblastique durant le 1^{er} trimestre chez la femme enceinte
- Figure 17 :** Synthèse et métabolisme de l'apéline
- Figure 18 :** Vue globale des différentes fonctions du système apélinergique
- Figure 19 :** Effet du système apélinergique sur le tonus vasculaire en absence et en présence de dysfonctions endothéliales
- Figure 20 :** Impact de la dénutrition maternelle sur le poids des fœtus, du placenta et sur le rapport fœto-placentaire au 13^{ème}, 17^{ème} et 21^{ème} jour de gestation
- Figure 21 :** Ontogénèse des taux d'apéline circulante maternelle durant la gestation
- Figure 22 :** Ontogénèse des taux fœtaux d'apéline circulante durant la gestation
- Figure 23 :** Localisation de l'expression fœtale de l'apéline et de son récepteur par hybridation *in situ*
- Figure 24 :** Impact de la dénutrition maternelle sur l'expression de l'apéline et du récepteur APJ dans le placenta et le triangle mésométrial durant la gestation
- Figure 25 :** Localisation de l'expression placentaire de l'apéline et de son récepteur par hybridation *in situ*
- Figure 26 :** Étude de l'expression placentaire d'apéline et de son récepteur APJ chez l'Homme par qRT-PCR dans le cadre de pathologies associées à un RCIU ou à une macrosomie
- Figure 27 :** Représentation schématique d'une expérience permettant d'étudier l'impact de l'apéline sur le transfert transplacentaire de glucose.

Des perturbations de la croissance fœtale à la
programmation des pathologies chez l'adulte

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

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

I. Adaptations physiologiques durant la grossesse

a) Fécondation, croissance embryonnaire et croissance fœtale

La gestation est un processus complexe durant lequel deux grandes phases ont lieu : la phase embryonnaire et la phase fœtale. La phase embryonnaire constitue le premier stade de la vie d'un individu. Elle est comprise entre la fécondation et l'apparition des premiers organes. La fécondation résulte de la formation d'une cellule diploïde non encore divisée, issue de la fusion de gamètes haploïdes, c'est à dire d'un gamète mâle : le spermatozoïde, et d'un ovocyte femelle. La plupart des organes se développent, durant la phase embryonnaire, avec une très grande rapidité. Il est estimé que 90 % des 4 500 structures tissulaires répertoriées chez l'adulte apparaissent à l'état d'ébauche durant ce stade (O'Rahilly et Müller, 1987). Il n'est donc pas étonnant que cette période de la grossesse soit très vulnérable à l'apparition de malformations chez l'embryon, ce qui conduit souvent à des avortements spontanés (Largo *et al.*, 1980).

Vient ensuite la phase fœtale qui est marquée par une augmentation considérable de la taille et de la masse du fœtus qui passe alors de quelques grammes à un peu plus de 3 kg au terme de la gestation (Tableau 1). Toutefois, il ne faut pas simplement restreindre ce stade à une simple augmentation de masse du fœtus. En effet, les organes qui se sont développés durant la période embryonnaire, croissent et subissent différents stades de maturation, aboutissant à terme au développement complet du nouveau-né. Chez l'Homme, la durée de la grossesse proprement dite est en moyenne de 266 jours soit 38 semaines. La période embryonnaire dure 56 jours soit 8 semaines et la période fœtale s'étend de la 9^{ème} semaine à la 38^{ème} semaine de la grossesse. Cependant, en obstétrique, le calcul des semaines de grossesse se fait généralement à partir de la date des dernières règles car c'est une date dont beaucoup de femmes se souviennent précisément. Sur cette base de calcul, la grossesse dure donc 40 semaines et la période embryonnaire 10 semaines.

b) Modifications maternelles liées à la grossesse

L'organisme maternel doit se préparer au développement rapide du fœtus qui a lieu majoritairement durant le dernier trimestre de la grossesse. C'est pourquoi rapidement après la fécondation, la femme enceinte va mettre en place de profondes adaptations physiologiques, hormonales, nutritionnelles et métaboliques afin d'assurer une croissance optimale du fœtus.

i. Changements physiologiques

La modification la plus marquée lors de la grossesse est l'augmentation du poids de la mère qui est d'environ 12 kg en fin de grossesse. Cet accroissement de poids est non seulement dû à la hausse du poids du fœtus, mais aussi la résultante du développement rapide d'autres tissus tels que les annexes fœtales comme le placenta et le liquide amniotique. Durant les deux premiers trimestres, certains tissus maternels comme les seins, l'utérus ou encore le tissu adipeux, vont également augmenter leur masse (Tableau 1). Ce phénomène, connu sous le nom de phase anabolique de la grossesse, a pour fonction de mettre en réserve des composés riches en énergie comme les lipides ou encore des molécules azotées pour la synthèse de protéines. Ces réserves énergétiques seront alors disponibles pour répondre aux besoins grandissant du fœtus durant la phase catabolique de la grossesse qui a lieu par la suite. À partir de la 25^{ème} semaine de grossesse, un fœtus, qui gagnait jusqu'alors 5 à 6 grammes par jour, va grossir en moyenne de 20 à 25 grammes par jour (Tableau 1). D'autres organes présentent aussi des adaptations comme l'appareil cardio-respiratoire. On note, par exemple, une augmentation du volume sanguin ainsi qu'une élévation de la ventilation de 50 %, nécessaires notamment afin d'assurer l'irrigation sanguine foeto-placentaire. Un placenta à terme demande un flux sanguin de 625 ml par minute afin de répondre aux besoins métaboliques du fœtus. Tous ces changements s'effectuent grâce à des signaux et notamment des hormones émises tôt durant la grossesse. Cependant, l'ensemble de ces signaux ne sont pas encore totalement connus.

ii. Modifications endocriniennes

Dès la fécondation, l'ovocyte produit l'hormone gonadotrophine chorionique (HCG) afin de stimuler le corps jaune de l'ovaire, c'est à dire le reste du follicule de De Graaf dont est issu l'ovule. Le corps jaune synthétise alors de la progestérone dont le but est de maintenir la vascularisation de l'endomètre ainsi que la densification de la muqueuse utérine. L'HCG permet à l'ovocyte de s'implanter et de se développer dans la muqueuse utérine en empêchant la venue des nouvelles règles. C'est pourquoi cette hormone sert de marqueur aux tests de dépistage de la grossesse. Jusqu'à la 10^{ème} semaine, la progestérone est synthétisée par le corps jaune. Par la suite, les cellules trophoblastiques placentaires la sécrèteront à partir du cholestérol circulant maternel. À ce stade, cette hormone aura pour fonction principale d'inhiber les contractions utérines, et ce, jusqu'à l'accouchement. La progestérone, sera également responsable, en association avec les œstrogènes, du développement et de la maturation des glandes mammaires. Le placenta va produire d'autres hormones comme l'hormone chorionique somatomammotrophique, encore appelée hormone lactogène. Cette hormone est sécrétée à partir de la 5^{ème} semaine dans la circulation maternelle et sa concentration va s'élever graduellement jusqu'en fin de grossesse. Cette hormone va préparer les glandes mammaires à la lactation mais surtout, l'hormone lactogène va participer grandement à la croissance du fœtus. En effet, elle va être en partie responsable de la résistance à l'insuline qui se met en place chez la femme enceinte et participe à l'accroissement du transfert du glucose au travers du placenta, en réduisant la capture du glucose par les tissus maternels. Cette hormone va également induire une lipolyse en fin de gestation et augmenter ainsi le taux d'acides gras libres circulants, capables eux aussi de traverser le placenta. Enfin, l'hormone lactogène va favoriser la synthèse des protéines, assurant le maintien de la masse maigre de la mère et permettant d'accroître le transfert transplacentaire d'acides aminés libres.

iii. Changements nutritionnels

Il est logique que l'appétit soit augmenté chez la femme enceinte afin de répondre aux demandes énergétiques croissantes de la grossesse. Une augmentation de la prise alimentaire est donc une réaction d'adaptation normale de la grossesse. Cependant, il est moins connu que

Tableau 2 : Prise de poids recommandée au cours de la grossesse en fonction de la corpulence de la mère à la conception. Adapté de (Abrams *et al.*, 2000).

IMC	Gain de poids recommandé (en kg pour 9 mois de grossesse)
< 19,8	12,5 à 18
19,8 - 26	11,5 à 16
26 - 29	7 à 11,5
> 29	6 à 10

les femmes mangent souvent un peu plus que ce qui est réellement nécessaire pour répondre à ces demandes. Il est ainsi estimé que 40 % des femmes ont une prise de poids supérieure à la prise optimale conseillée durant la grossesse (Sarwer *et al.*, 2006). Le coût théorique d'une grossesse est estimé à environ 80 000 kcal (soit, en moyenne 285 kcal par jour). Les dépenses énergétiques se répartissent sur trois postes couvrant les besoins du fœtus et des annexes fœto-placentaires (10 000 kcal soit environ 40 kcal par jour), la constitution des réserves lipidiques de la mère (35 000 kcal pour 3 à 4 kg de masse adipeuse) ainsi que l'augmentation du métabolisme maternel de base à partir du 2nd trimestre (35 000 kcal pour une augmentation de 20 %). Ainsi, la plus grande partie des dépenses énergétiques n'est pas liée au fœtus. Bien que ce coût théorique de la grossesse est sensiblement le même pour chaque femme, les besoins énergétiques eux sont variables d'une femme à l'autre et vont principalement dépendre de l'indice de masse corporelle (IMC) de la mère. En théorie, une femme possédant un IMC classé comme "normal" devrait se nourrir de façon à avoir une prise de poids de 1 kg par mois pendant les deux premiers trimestres puis de 400 à 500 g par semaine lors du dernier trimestre (Tableau 2). Cependant, il sera conseillé aux femmes maigres de veiller à assurer des apports énergétiques et une prise de poids suffisants pour optimiser le poids de naissance du bébé car elles ont plus de risques d'avoir un enfant de faible poids. Le cas des femmes fortes à obèses est plus délicat car exposées à des risques obstétricaux incluant l'hypertension, la pré-éclampsie et le diabète gestationnel (Bhattacharya *et al.*, 2007). Bien qu'il soit nécessaire de limiter la prise de poids de ces mères, il ne faut absolument pas occasionner de carences énergétiques et nutritionnelles afin d'éviter les risques d'hypotrophie fœtale. En pratique, il est difficile d'établir une "norme" en matière d'apport énergétique conseillé.

L'augmentation de la prise alimentaire s'effectue très tôt durant la grossesse, bien avant l'implantation de l'embryon dans la muqueuse utérine, ce qui indique que l'augmentation de la prise alimentaire n'est pas simplement une réponse à la demande énergétique de l'embryon mais plutôt une anticipation à cette future demande. En effet, il a été montré chez la rate gestante, une légère hyperphagie dès le 4^{ème} jour de gestation (Ladyman et Grattan, 2004). Les mécanismes aboutissant à cette hyperphagie ne sont pas totalement compris mais peuvent être en partie expliqués par une résistance à la leptine transitoire durant la gestation (Mounzih *et al.*, 1998a). Durant la grossesse, l'augmentation de l'adiposité maternelle est accompagnée d'une forte augmentation des taux plasmatiques de leptine chez le rat et l'Homme (Chien *et al.*, 1997 ; Masuzaki *et al.*, 1997). En condition normale, la leptine va agir comme un facteur anorexigénique au niveau des noyaux contrôlant la prise alimentaire de l'hypothalamus (Coll

et al., 2007). Le noyau arqué de l'hypothalamus va être particulièrement sensible à l'action de la leptine. Ce noyau contient deux groupes interconnectés de neurones : les neurones orexigéniques produisant le neuropeptide Y (NPY) et l'*Agouti-Related Peptide* (AgRP) qui augmentent la prise alimentaire et les neurones à proopiomélanocortine (POMC) et *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript* (CART) connus pour leurs effets anorexigènes (Könner *et al.*, 2009). La leptine va stimuler les neurones à POMC/CART et inhiber les neurones à NPY/AgRP, ce qui aboutira à une diminution de la prise alimentaire. Or, durant la gestation, plusieurs études ont montré que la résistance à l'insuline va agir à plusieurs niveaux pour bloquer l'action anorexigénique de la leptine et ainsi favoriser le stockage de réserve énergétique dans le tissu adipeux. Ainsi, en dépit de l'augmentation des taux de leptine, l'expression de l'ARNm de la POMC dans le noyau arqué est constante durant la gestation (Mann *et al.*, 1997 ; Ladyman *et al.*, 2009). De même, l'expression du NPY et de l'AgRP a été montrée chez le rat pour être stable voire légèrement augmentée (Rocha *et al.*, 2003 ; Wilding *et al.*, 1997 ; Ladyman *et al.*, 2009).

Les phénomènes de résistance à la leptine peuvent se dérouler à 3 niveaux distincts : avant l'action du ligand sur son récepteur, au niveau du récepteur ou encore au niveau de la signalisation intracellulaire. Dans le cadre de la résistance à la leptine durant la gestation, il n'a pas été observé de diminution de l'expression des récepteurs à la leptine dans le noyau arqué (Ladyman et Grattan, 2005). Cependant, le transport de la leptine au niveau plasmatique semble être perturbé de par une augmentation de l'expression et/ou de l'activité des protéines de liaisons circulantes ou *leptin binding proteins* (Gavrilova *et al.*, 1997 ; Seeber *et al.*, 2002). Enfin, une diminution de la signalisation intracellulaire de la leptine a aussi été observée dans les noyaux hypothalamiques chez la rate gestante (Ladyman et Grattan, 2004 ; Ladyman et Grattan, 2005).

iv. Changements métaboliques

Le glucose étant la principale source d'énergie du fœtus, le métabolisme glucidique est modifié durant la grossesse. Durant les deux premiers trimestres, une hyperinsulinémie ainsi qu'une légère augmentation de la sensibilité à l'insuline sont constatées, ce qui permet la constitution des réserves énergétiques et azotées chez la mère (Sorenson et Brelje, 1997). L'insuline va ainsi stimuler la synthèse protéique ainsi que la glycogénogenèse dans le foie et la formation de triglycérides dans les cellules adipeuses (Homko *et al.*, 1999).

Cette hyperinsulinémie est liée à une augmentation de la masse de cellules β -pancréatiques maternelles. Cette augmentation serait en partie due à l'action de l'hormone lactogène sur le récepteur de la prolactine, ou encore à l'action de la sérotonine, sur les cellules β , ce qui induirait leur réplication ainsi que leur hypertrophie (Vasavada *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2010). Cette hyperinsulinémie sera, par la suite, couplée à une résistance à l'insuline durant le dernier trimestre de la grossesse. La réduction de la sensibilité à l'insuline va permettre un changement ou "*switch*" métabolique chez la mère passant ainsi d'un métabolisme glucidique à l'utilisation des substrats lipidiques comme les acides gras libres (Buchanan, 1995). Ceci induira des hyperglycémies postprandiales prolongées qui permettront un transfert accru de glucose vers le fœtus au travers du placenta (Yamashita *et al.*, 2000 ; Bartha *et al.*, 2000). Ces modifications sont probablement liées aux changements hormonaux, comme par exemple l'élévation de l'hormone lactogène circulante, de la progestéronémie ou encore de la cortisolémie qui sont connues pour être toutes corrélées avec la mise en place d'une résistance à l'insuline (Giorgino *et al.*, 1993 ; Nelson *et al.*, 1994).

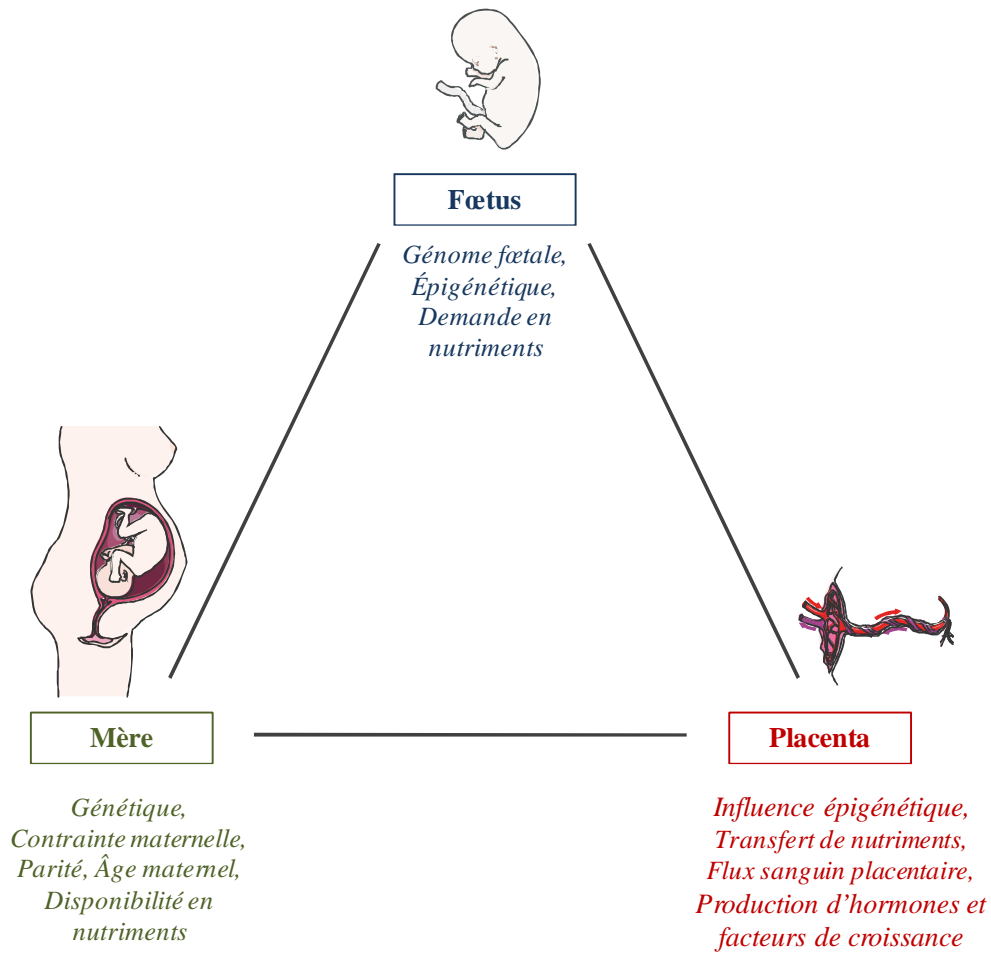


Figure 1 : Représentation des interactions entre la mère, le fœtus et le placenta sur la croissance fœtale durant la grossesse humaine. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art.

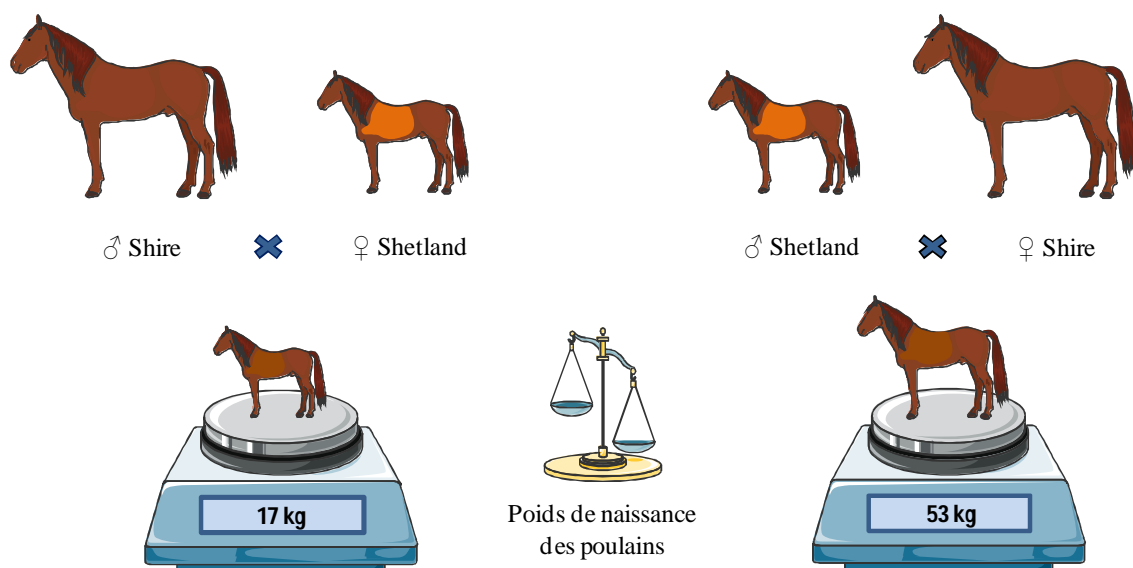


Figure 2 : Représentation schématique de l'expérience de Walton et Hammond. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art.

II. Croissance fœtale et régulations

Le fœtus humain se développe en suivant une trajectoire de croissance qui s'équilibre entre les besoins nutritionnels du fœtus et la capacité de la mère à les lui apporter. Le potentiel de croissance est inscrit dans le génome fœtal et joue un rôle important dans le développement *in utero*. Cependant, il est maintenant reconnu que la croissance du fœtus est aussi sensible à l'environnement physiologique maternel et placentaire. La croissance fœtale est également soumise à un équilibre permettant au fœtus de se développer tout en évitant d'avoir une prise de poids trop importante, ce qui rendrait l'accouchement difficile. Il existe donc un contrôle multifactoriel de la croissance fœtale qui implique les 3 principaux acteurs de la grossesse : la mère, le fœtus et le placenta (Figure 1).

a) Influence des parents

Des études ont montré que des enfants provenant de mêmes parents ont des poids de naissance similaires (Morton, 1955). Cependant, d'autres études ont montré que le poids de naissance est comparable pour des enfants provenant de la même mère mais de pères différents mais pas inversement, c'est à dire de même père et de mères différentes. Ceci suggère une implication limitée du patrimoine génétique paternel sur la régulation de la croissance fœtale et un rôle préférentiel du patrimoine maternel dans ce processus. De plus, une corrélation entre le poids de la mère et celui de ses enfants a été également démontrée (Ounsted *et al.*, 1988).

i. La taille de la mère

Les expériences de Walton et Hammond en 1938 (Figure 2) ont permis de mettre en évidence la notion de contrainte maternelle sur la croissance fœtale grâce à des croisements entre des chevaux de grande taille de race Shire, avec des poneys de petite taille de race Shetland. Ces auteurs ont rapporté que le croisement entre un mâle Shire et une femelle Shetland induit des poneys moins lourds que le croisement inverse alors qu'ils possèdent tous deux le même génome (Walton et Hammond, 1938). Une autre étude, concernant les dons

d'ovules chez l'Homme, a également montré que le poids de naissance est corrélé avec la taille de la mère receveuse mais pas avec celle de la mère donneuse (Brooks *et al.*, 1995). Cette observation permet ainsi d'éliminer totalement l'influence de l'ADN mitochondrial qui est transmis par la mère uniquement et qui était envisagé jusqu'alors comme une explication possible à ce phénomène. La taille de la mère est donc l'un des facteurs intervenant dans le contrôle de la croissance fœtale puisqu'elle est corrélée à la capacité de l'utérus à supporter la croissance fœtale (Cogswell et Yip, 1995). Ce phénomène permet ainsi de limiter la croissance fœtale afin d'éviter des problèmes lors de l'accouchement. Cependant, l'influence de la contrainte maternelle est également limitée puisque la somme des masses des jumeaux excède souvent la masse d'un bébé seul, même si leurs poids sont inférieurs.

ii. Influence de la parité

La parité est un terme utilisé en obstétrique pour décrire le nombre d'enfants vivants mis au monde par une femme. De nombreuses études ont mis en évidence que le poids de naissance du premier enfant est inférieur à celui des suivants (Ong *et al.*, 2002). Les mécanismes de l'effet de la parité sur le poids fœtal ne sont pas totalement compris. Cependant, une influence de la vascularisation utéro-placentaire a été suggérée (Hafner *et al.*, 2000). Ce phénomène n'est pas clairement compris et pourrait s'expliquer en terme d'évolution. Il permettrait de limiter l'investissement énergétique et métabolique maternel durant sa première grossesse, dans le but d'assurer sa propre survie et de nourrir son premier enfant et donc d'avoir par la suite d'autres enfants.

iii. Influence de l'âge maternel

Chez l'animal et l'Homme, les individus adolescents donnent naissance à des enfants de plus petite masse (Kirchengast et Hartmann, 2003). Il a été suggéré que cette influence serait due principalement au concept de contrainte maternelle. Cependant, il est possible que ce phénomène soit dû à une compétition entre la demande énergétique nécessaire pour la croissance de la mère et celle de son enfant. En effet, la phase de stockage énergétique, ou phase anabolique, a tendance à se prolonger chez ces jeunes mères. Des expériences menées chez la brebis ont montré que cette compétition persiste même si la mère est

suralimentée (Wallace *et al.*, 1999). Une autre étude plus récente a montré que durant la gestation chez la jeune brebis diminuerait sensiblement la taille du placenta, ce qui limiterait le transfert de nutriments vers le fœtus (Wallace *et al.*, 2003). Ceci pourrait s'expliquer en terme d'évolution par un mécanisme protecteur maternel qui favoriserait à court terme la croissance et la survie de la jeune mère, au détriment des chances de survie de l'enfant.

iv. *Influence maternelle sur le flux sanguin de l'artère utérine*

Les besoins métaboliques du fœtus et du placenta croissent rapidement durant la gestation. C'est pourquoi de profondes adaptations du système cardiovasculaire maternel vont avoir lieu. À terme, on observe chez les femmes enceintes une augmentation du volume sanguin de 40 % et du débit cardiaque de 35 % (Ueland, 1976). Le flux sanguin de l'artère utérine est augmenté environ 3 fois, passant de 95 ml par minute chez la femme non enceinte à 342 ml par minute à terme (Thaler *et al.*, 1990).

v. *Influence de l'environnement maternel*

L'environnement maternel comprend toutes les influences non génétiques qui influenceront le phénotype de leur descendance. Ainsi, l'environnement maternel va être étroitement lié à son style de vie. Dans le cadre d'une croissance fœtale normale, Il va donc principalement impliquer la qualité du régime alimentaire de la mère puisqu'elle est, *via* le placenta, la principale source de nutriments du fœtus. L'environnement maternel étant une cause importante de retard de croissance intra-utérin, cette influence sera détaillée par la suite.

Tableau 3 : Classification de la morphologie placentaire.

Nom	Définition	Représentation schématique du placenta par rapport à l'utérus	Barrière placentaire	Espèce
Placenta diffus	L'ensemble de la surface placentaire est en contact avec la surface utérine		épithélio-chorial	Jument, truie
Placenta cotylédonaire	Les contacts placentaires s'effectuent de façon multiple de par la formation de cotylédons sur l'ensemble de la surface utérine.		épithélio-chorial	Ruminant
Placenta zonal	Seule une bande annulaire ceinturant le trophoblaste assure les contacts où se différencient les villosités placentaires		endothélio-chorial	Carnivore
Placenta discoïde	Seule la partie du conceptus qui envahit l'endomètre participe à la formation du placenta		hémo-chorial	Homme, primates et rongeurs

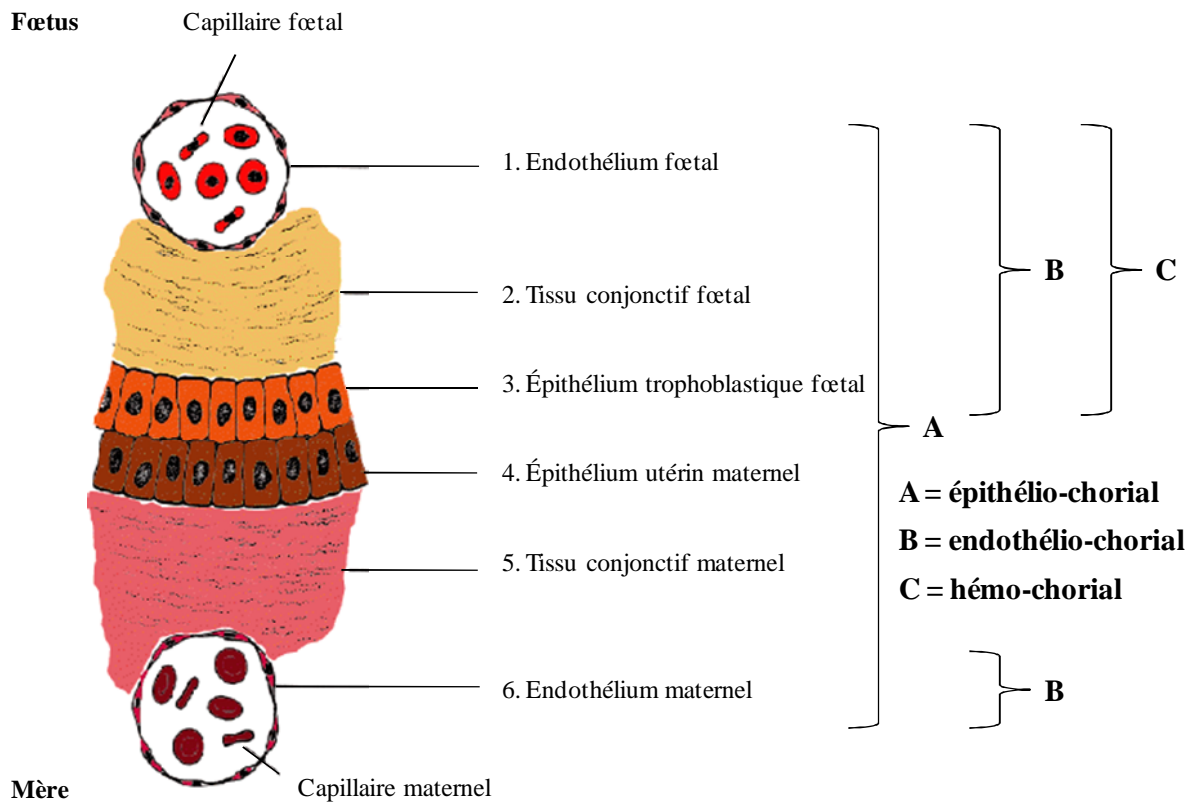


Figure 3 : Représentation des différents types de barrière placentaire d'après leurs compositions cellulaires. Adaptée du site <http://9e.devbio.com/image.php?id=298>.

b) Le placenta

Étant au centre des échanges entre la mère et son fœtus, le placenta joue un rôle important dans la régulation de la croissance fœtale. Afin d'améliorer la compréhension de cette thèse, je débiterai par quelques généralités sur le placenta avant d'en expliquer son fonctionnement.

i. Classification et description

Le placenta est une annexe embryonnaire transitoire caractéristique des euthériens, appelés également mammifères placentaires. Le placenta possède des caractéristiques fonctionnelles communes mais présente, au niveau macroscopique et microscopique, une organisation tissulaire très complexe propre à chaque espèce. Deux caractéristiques morphologiques, particulièrement divergentes, sont utilisées comme base de la classification du type placentaire (Tableau 3). La première est la forme du placenta qui, associée à sa position face aux membranes fœtales, va permettre la classification en 4 groupes différents. La seconde concerne l'organisation et les types cellulaires présents entre le système vasculaire maternel et fœtal qui constitue la barrière fœto-placentaire, lieu des transferts de molécules entre ces deux compartiments (Figure 3). Les mécanismes d'échanges fœto-maternels sont influencés par l'épaisseur des couches tissulaires séparant l'embryon de la mère. Cette barrière sera d'autant plus mince que le placenta pénètre de manière invasive dans la muqueuse utérine.

Le placenta des primates, tout comme celui des rongeurs, est de forme discoïde et possède une vascularisation de type hëmo-choriale, c'est-à-dire, que le sang maternel est directement en contact avec la barrière fœto-placentaire dont les cellules qui la composent ont une origine exclusivement fœtale. Chez l'Homme, le sang maternel, issu des artères spiralées utérines, est injecté dans des lacunes appelées chambres intervilleuses au sein desquelles se trouvent des capillaires fœtaux connectés aux vaisseaux ombilicaux (Figure 4). Le sang du fœtus arrive au placenta *via* deux artères ombilicales et en repart purifié des déchets métaboliques et chargé en oxygène et nutriments, par une veine ombilicale unique (Malassiné *et al.*, 2003).

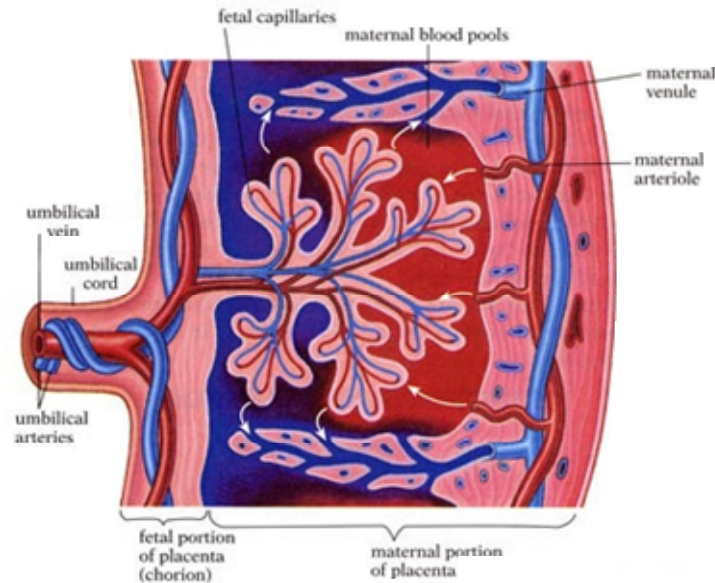


Figure 4 : Représentation schématique d'un placenta humain montrant l'organisation de la vascularisation fœto-placentaire.

D'après <http://www.biog1105-1106.org/demos/105/unit8/ovaryplacenta.html>.

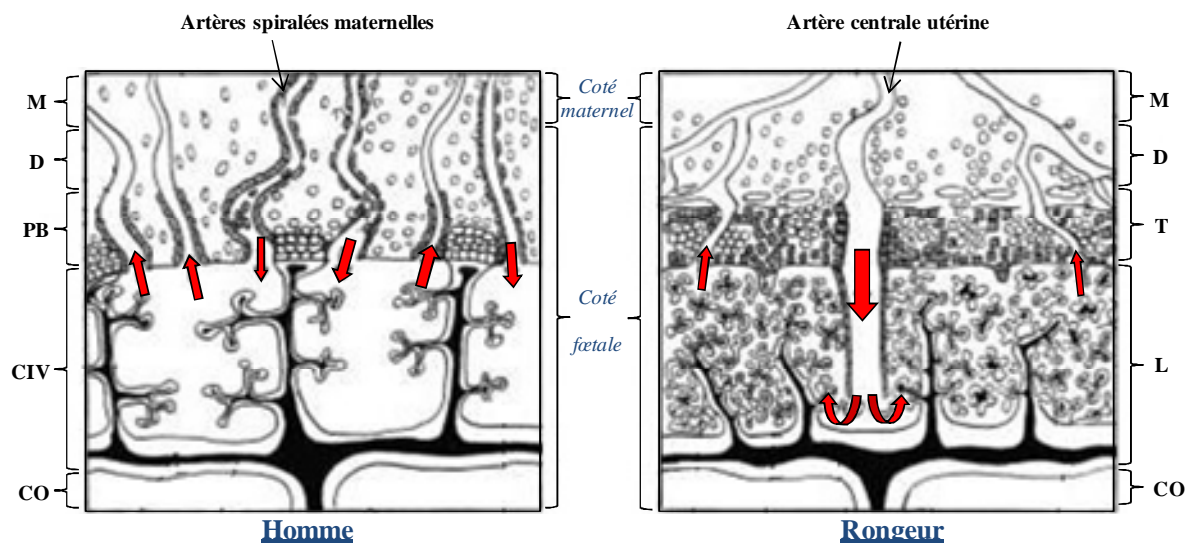


Figure 5 : Représentations comparatives schématiques simplifiées du placenta chez l'Homme et le rongeur montrant l'organisation de la vascularisation fœto-placentaire.

Adaptée de (Georgiades *et al.*, 2002). Le placenta de souris possède une zone d'échange fœto-maternel plus dense que celle de l'Homme. Les flèches indiquent le sens de circulation du sang maternel dans les chambres intervillieuses. CIV : chambre intervillieuse ; CO : cordon ombilical ; D : decidua ; L : labyrinthe ; M : mésomètre ; T : trophospongium ; PB : plaque basale.

ii. Rôle du placenta

Les fonctions majeures du placenta sont de promouvoir la viabilité et la croissance fœtale. Il participe donc, d'une part, aux mécanismes de tolérance maternelle envers les antigènes fœto-paternels et régule, d'autre part, les échanges materno-fœtaux. Il sécrète également de nombreuses hormones stéroïdes et peptidiques qui participent non seulement au contrôle de la croissance fœtale, mais influent aussi chez la mère en assurant, par exemple l'adaptation physiologique à l'accouchement ou encore en agissant sur les glandes mammaires pour préparer à la lactation. Néanmoins, le principal contrôle placentaire de la croissance du fœtus repose sur sa capacité à échanger des substances comme l'oxygène, le dioxyde de carbone, l'eau, les nutriments et les déchets métaboliques entre la mère et son fœtus. C'est pourquoi la taille du fœtus à la naissance est un bon index de la qualité de ces échanges durant la grossesse (Desforges et Sibley, 2010). Pour cela, les cellules comprises entre les circulations maternelles et fœtales assurent des fonctions spécifiques de transports de molécules qui s'amplifient durant la grossesse. Ce transport s'effectue au sein des arbres villositaires (ou villosités placentaires) situés dans les chambres intervillieuses chez l'Homme et dans la zone du labyrinthe chez les rongeurs (Figure 5) (Malassiné *et al.*, 2003). À titre d'exemple, on observe dans ces zones pour le glucose, un transport par diffusion facilitée *via* des transporteurs membranaires de type GLUT (Hay, 1995), pour les acides aminés, des transporteurs actifs sodium dépendants et indépendants (Jones *et al.*, 2007) et, pour les lipides, des lipoprotéines lipases placentaires hydrolysent les triglycérides circulants maternels libérant ainsi des acides gras. Le transfert de ces acides gras s'effectue ensuite vers le fœtus, par diffusion dans les cellules placentaires puis passage transcellulaire par l'intermédiaire de *fatty-acid binding proteins* (Haggarty, 2002).

c) Influence épigénétique et empreinte parentale

Comme nous l'avons vu précédemment, l'influence génétique sur la croissance fœtale est limitée. En effet, il a été estimé que 20 % du patrimoine génétique maternel et 18 % du patrimoine paternel sont responsables des variations de la croissance fœtale (Robert et Bear, 1997). L'environnement va donc avoir un fort impact sur le développement du fœtus. L'impact de l'environnement peut s'effectuer de différentes façons comme par exemple par des modulations de type épigénétique. Il a ainsi été montré que l'épigénotype est sensible aux conditions environnementales *in utero* et pourrait porter la mémoire d'expositions délétères issues de l'environnement. Ces différents environnements peuvent altérer l'expression des gènes de manière réversible ou irréversible sans altération de la séquence nucléotidique de l'ADN (Waterland, 2009). Il existe différents types de modification épigénétique qui, mis à part leur influence sur la différenciation des cellules fœtales, vont jouer un rôle important dans le développement du placenta.

i. Méthylation de l'ADN

Au niveau des séquences promotrices d'un gène, on peut trouver des méthylations au niveau des résidus cystéines de l'ADN qui sont suivies par une guanine : les dinucléotides CpG. Un regroupement de séquences riches en CpG est appelé îlot CpG. La méthylation de ces îlots va créer un encombrement stérique empêchant la fixation de facteurs de transcription au niveau des séquences promotrices des gènes (Waterland et Garza, 1999). La méthylation de l'ADN dépend de plusieurs facteurs et notamment de l'environnement nutritionnel, de par l'ingestion de molécules nutritives donneuses de groupements méthyles (Waterland *et al.*, 2006).

La répartition du taux global de méthylation entre l'ADN des annexes extra-embryonnaires et celui du fœtus n'est pas équitable puisque l'ADN placentaire est globalement hypométhylé (Santos *et al.*, 2002). En dépit de cela, la méthylation de l'ADN est indispensable pour le développement des cellules placentaires. Ainsi, l'administration d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, le 5'-aza-2'-deoxycytidine, à des rates gestantes interrompt la prolifération des cellules trophoblastiques et induit une profonde diminution de la masse placentaire lorsque ce traitement a lieu au milieu de la gestation (Serman *et al.*,

2007). Une autre étude a également montré que ce traitement inhibe également l'invasion trophoblastique des artères spiralées maternelles qui est un phénomène permettant d'augmenter les échanges vasculaires fœto-maternels (Rahnama *et al.*, 2006). Enfin, les souris homozygotes déficientes en DNA méthyltransferases Dnmt1 et Dnmt3L présentent de sévères malformations placentaires avec une absence de formation du labyrinthe et une réduction du trophospongium (Li *et al.*, 1992 ; Arima *et al.*, 2006).

ii. Modifications des histones

Le nucléosome est un complexe protéique constitué d'un octamère d'histone, de structure 2x (H2A, H2B, H3 et H4) sur lequel est enroulé l'ADN. Les parties N-terminales de ces histones dépassent du nucléosome et vont subir sur certains de leurs acides aminés des modifications post-traductionnelles de type méthylation, acétylation, phosphorylation ou encore ubiquitinylation, ce qui va influencer la transcription génique. À l'inverse de la méthylation de l'ADN, les modifications des histones vont permettre une régulation à plus court terme de l'expression génique, ce qui sera important pour la plasticité développementale.

Ces mécanismes vont permettre l'activation sélective de nombreux gènes spécifiques du placenta comme, par exemple, la syncytine qui joue un rôle important dans la maturation des cellules trophoblastiques (Chuang *et al.*, 2006). Ces types de modifications concernent aussi la synthèse de certaines hormones. Ainsi, durant la gestation, l'hormone de croissance placentaire remplace progressivement l'hormone de croissance d'origine hypophysaire. Ce changement d'expression a été démontré pour s'effectuer également sous le contrôle de modifications épigénétiques des histones (Kimura *et al.*, 2004).

iii. Empreinte parentale

Dans les organismes diploïdes, les allèles maternels et paternels de la plupart des gènes sont exprimés à des taux similaires et donc contribuent de façon égale au phénotype. Cependant, chez les euthériens (comme l'Homme et la souris) ainsi que chez les marsupiaux, les allèles parentaux ne fonctionnent pas toujours de façon équivalente. En effet, des expériences génétiques ont permis de montrer chez la souris que certains segments

des chromosomes ont une fonction différente en regard avec leurs origines parentales (Cattanach et Kirk, 1985). Les gènes soumis à une empreinte parentale ne sont pas répartis équitablement dans le génome mais plutôt regroupés dans des zones appelées "*clusters*" placés sous le contrôle d'une région régulatrice (ICR pour "*imprinting control region*") caractérisée par une méthylation différentielle des dinucléotides CpG (DMR pour "*differentially methylated region*") et qui contrôle la transcription de ces gènes. À ce jour, environ 130 de ces gènes ont été découverts chez la souris et près de 70 chez l'Homme (Nelissen *et al.*, 2011). Le but de cette empreinte parentale durant la croissance fœtale n'est pas entièrement compris. Cependant, en 1991, Moore et Haig ont émis l'hypothèse d'un conflit parental génétique qui énonce que les copies paternelles de ces gènes ont tendance à augmenter le transfert de nutriments vers le fœtus et ainsi favoriser sa croissance, tandis que les copies d'origines maternelle vont plutôt contrebalancer l'action des gènes paternels et restreindre la croissance fœtale et postnatale afin de restreindre la dépense énergétique maternelle. Ainsi, dans le cadre d'une grossesse normale, l'action de ces deux forces opposées va assurer une croissance fœtale normale alors que l'inactivation d'un de ces gènes va induire de profondes perturbations de la croissance placentaire et fœtale (Piedrahita, 2011). Une récente étude permet de faire le lien entre l'environnement maternel, notamment nutritionnel, et la régulation de l'empreinte parentale. Ces auteurs ont montré qu'un régime riche en graisses durant la gestation chez la souris augmente le poids du placenta et affecte la méthylation des gènes soumis à empreinte de façon sexuellement dimorphique (Gallou-Kabani *et al.*, 2010).

d) Régulations endocrines

La mère, le fœtus et plus particulièrement le placenta produisent des hormones qui assurent le maintien de la gestation et modulent la croissance fœtale. Dans cette partie, je me concentrerai sur les hormones les mieux décrites à ce jour.

i. Le système insuline/Insulin-like growth factor

L'insuline favorise la croissance du fœtus en agissant comme un signal de disponibilité en nutriments. En effet, la pancréatectomie chez le fœtus ou le traitement par la streptozotocine (une molécule détruisant les cellules β -pancréatiques) entraînent tous deux un RCIU (Fowden et Comline, 1984 ; Fowden, 1995). L'insuline agit comme un promoteur de la croissance fœtale de par son action sur le métabolisme. Ainsi, la perfusion d'insuline chez le fœtus se traduit par une augmentation de sa captation de glucose associée à une augmentation de la prolifération cellulaire (Fowden, 1995). La concentration d'insuline fœtale à terme est positivement corrélée avec la glycémie et le poids de naissance du fœtus (Fowden, 1995). D'autres études ont montré que la concentration d'insuline au niveau du cordon ombilical est plus faible en cas de RCIU (Osmanağaoğlu *et al.*, 2005). Cependant, il est également probable que l'insuline agisse indirectement sur la croissance fœtale par son action sur la sécrétion des facteurs de croissance hépatiques : les *insulin-like growth factors* (IGF).

Les IGF sont connus pour stimuler la croissance fœtale. Des souris déficientes en IGF-I ou en IGF-II ont un poids de naissance à terme fortement réduit (DeChiara *et al.*, 1990 ; Liu *et al.*, 1993). La délétion du récepteur IGF de type 1, responsable de l'action d'IGF-I et d'IGF-II, cause un retard de croissance fœtal encore plus important (Liu *et al.*, 1993). Des études menées chez différentes espèces ont montré une relation entre la concentration plasmatique fœtale d'IGF-I avec le poids de naissance. Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée avec IGF-II (Klauwer *et al.*, 1997). IGF-I semble avoir un rôle direct sur la prolifération des cellules fœtales, tandis qu'IGF-II va influencer le développement placentaire. En effet, la délétion de ce gène chez le fœtus, ou seulement dans le labyrinthe placentaire (souris IGF2P0), diminue le poids du placenta de 30 à 50 % à terme (DeChiara *et al.*, 1990 ; Sibley *et al.*, 2004). L'influence d'IGF-II sur la morphologie placentaire va altérer le transfert de nutriments vers le fœtus puisqu'on observe une diminution de 30 à 40 % de la diffusion

passive transplacentaire chez les souris IGF2P0 (Sibley *et al.*, 2004). À l'inverse d'IGF-II, IGF-I n'a que peu d'effets sur la taille placentaire. Cependant, IGF-I et IGF-II semblent agir directement sur le transfert de nutriments vers le fœtus. Ainsi, l'injection *in utero* d'IGF-I chez l'agneau accroît la consommation placentaire de glucose (Bloomfield *et al.*, 2002). Un traitement de cellules trophoblastiques humaines par l'IGF-I augmente également le transfert de glucose et d'acides aminés vers le fœtus (Karl, 1995), tandis qu'un traitement par IGF-II n'augmente spécifiquement que le transfert d'acides aminés (Kniss *et al.*, 1994).

ii. Les adipocytokines

Les adipocytokines sont des peptides et protéines solubles de communication majoritairement synthétisées par le tissu adipeux et qui vont agir à distance sur d'autres cellules ou tissus pour en réguler l'activité et la fonction. De récentes données montrent que les adipocytokines produites à la fois par la mère, le fœtus et le placenta jouent un rôle important dans le contrôle de la croissance fœtale. Dans cette partie, je me focaliserai plus particulièrement sur celles dont le rôle a été le plus étudié, c'est à dire la leptine et l'adiponectine.

L'impact de la leptine sur la croissance fœtale n'est pas clairement démontré et semble dépendant de l'espèce étudiée. Les souris déficientes en leptine ont une morphologie ainsi qu'un poids de naissance normaux (Mounzih *et al.*, 1998b). Chez l'Homme, la concentration ombilicale de leptine à terme est positivement corrélée avec le poids du placenta ainsi qu'avec de nombreux indicateurs de la croissance fœtale comme le poids, la taille, l'adiposité et le contenu minéral osseux (Varvarigou *et al.*, 1999 ; Javaid *et al.*, 2005). La leptine et ses récepteurs sont largement exprimés dans le placenta chez l'Homme, ce qui suggère un rôle sur son développement et son fonctionnement (Hoggard *et al.*, 2001). Un traitement à la leptine sur des cultures de trophoblastes humains diminue l'apoptose et augmente la prolifération de ces cellules (Magariños *et al.*, 2007). La leptine stimule également l'activité du système A, qui est un système de transporteurs membranaires des acides aminés neutres (Jansson *et al.*, 2003). Malgré ces effets sur le placenta, il est possible que la leptine *in utero* ne soit, comme chez l'adulte, qu'un signal du statut nutritionnel et de l'adiposité fœtale. Il est également possible que la leptine fœtale ne soit produite qu'en réponse à la stimulation du tissu adipeux fœtal par l'insuline ou par d'autres facteurs (Devaskar *et al.*, 2002).

Contrairement à la leptine, la concentration d'adiponectine est inversement corrélée chez l'adulte avec la masse corporelle et la quantité de tissu adipeux (Arita *et al.*, 1999). L'adiponectine diminue la glycémie en inhibant la néoglucogenèse hépatique et en augmentant l'action de l'insuline dans le muscle squelettique (Yamauchi *et al.*, 2001). L'origine de l'adiponectine fœtale n'est pas connue. Cependant, une origine placentaire est possible puisque son expression a été retrouvée chez le rat et l'Homme (Caminos *et al.*, 2005). Les taux d'adiponectine dans la circulation fœtale sont plus importants que ceux de l'adulte et sont positivement corrélés avec l'âge gestationnel et le poids de naissance dans le cadre de grossesses non pathologiques (Sivan *et al.*, 2003 ; Kajantie *et al.*, 2004). L'adiponectine est fortement exprimée par les cellules endothéliales et il est possible que son action sur la croissance fœtale se réalise *via* un mécanisme pro-angiogénique (Pinar *et al.*, 2008). À l'inverse, d'autres études suggèrent qu'elle induirait plutôt une diminution de la croissance fœtale puisqu'elle augmente l'apoptose des cellules placentaires (Benaitreau *et al.*, 2009 ; Jarvenpaa *et al.*, 2009), mais aussi réduit, *in utero*, l'action de l'insuline, en diminuant l'expression des transporteurs de glucose GLUT3 et celle des transporteurs d'acides aminés du système A (Caminos *et al.*, 2005 ; Jones *et al.*, 2010a).

iii. Les glucocorticoïdes

À l'inverse des hormones décrites précédemment, les glucocorticoïdes vont restreindre la croissance du fœtus. En effet, dans de nombreuses espèces, l'administration chez la mère ou chez son fœtus de glucocorticoïdes va conduire à une diminution du poids du fœtus dont la sévérité va être liée à l'intensité du traitement (Fowden *et al.*, 1998). Les glucocorticoïdes sont des molécules lipophiles qui sont capables de traverser facilement le placenta. C'est pourquoi il existe à ce niveau une enzyme appelée 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2) qui va inactiver en partie les glucocorticoïdes (le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez les rongeurs), ce qui va réguler le niveau d'exposition du fœtus à ces hormones. Cependant, une partie des glucocorticoïdes maternels va pouvoir passer cette barrière placentaire (Benediktsson *et al.*, 1997). Chez le rat, l'inhibition de la 11 β -HSD2 diminue le poids de naissance (Lindsay *et al.*, 1996a). Les glucocorticoïdes exercent aussi un rôle important sur le métabolisme du fœtus. En effet, ils stimulent le stockage du glycogène

dans le foie et le muscle fœtal (Bloom *et al.*, 2001) et diminuent la synthèse protéique (Yajnik *et al.*, 1995). Cependant, il est également possible que l'action des glucocorticoïdes sur la croissance fœtale soit en partie liée à des modifications morpho-fonctionnelles placentaires. En effet, dans de nombreuses espèces, l'administration de glucocorticoïdes de synthèse en fin de gestation diminue le poids du placenta. Ces traitements induisent une baisse de la prolifération cellulaire et augmentent l'apoptose des cellules placentaires (Baisden *et al.*, 2007). Ils peuvent également affecter l'expression des transporteurs de glucose placentaire de type GLUT. Cependant, cet effet semble être dépendant de la dose et de la durée du traitement. Ainsi, une exposition à court terme réduit l'expression des GLUT1 et GLUT3 placentaires, tandis qu'un traitement à plus long terme semble au contraire les augmenter (Langdown et Sugden, 2001); (Lesage *et al.*, 2002).

III. Les altérations de la croissance fœtale

a) Petit poids de naissance et RCIU : définition et épidémiologie

Un petit poids de naissance est actuellement défini par un poids dont la valeur est inférieure au 10^{ème} percentile, à la naissance, par rapport aux courbes de croissance fœtale ou encore par un poids inférieur à 2 500 g pour une naissance à terme. Cette définition est parfois utilisée pour définir le retard de croissance intra-utérin (RCIU). Cependant, il est impératif de faire la différence entre ces deux termes. En effet, jusque dans les années 1960, les données concernant le RCIU englobaient de façon aberrante chaque naissance dont le poids était inférieur à 2 500 g sans tenir compte de l'âge gestationnel. La notion de "petit pour l'âge gestationnel", c'est à dire des enfants dont le poids est inférieur au 10^{ème} percentile en fonction de l'âge gestationnel est apparu plus tard (Battaglia et Lubchenco, 1967). Ainsi, la notion de petit poids de naissance englobe à la fois les naissances présentant un RCIU et les naissances d'enfants prématurés, c'est à dire nés avant la 37^{ème} semaine de grossesse (Figure 6). Le RCIU est donc une notion plus dynamique qui implique que le fœtus n'arrive pas à atteindre son potentiel de croissance par rapport à ce qui est attendu et, qui se traduit par un ralentissement voire un arrêt de sa croissance *in utero*. Cependant, il est également nécessaire de faire la distinction, parmi les enfants présentant un petit poids de naissance, entre un enfant qui est constitutionnellement petit et qui a atteint son potentiel de croissance, et un autre enfant qui lui présente une véritable restriction de sa croissance liée à un processus pathologique impliquant des risques importants de complications à court et à long terme. Ainsi, 25 à 60 % des enfants désignés comme petit pour leur âge gestationnel ont en fait une croissance tout à fait normale sans décrochage de la courbe de croissance (Manning et Hohler, 1991 ; Gardosi *et al.*, 1992). De même, un nouveau-né peut également présenter un poids de naissance situé entre les limites normales des courbes de référence mais avoir subi un ralentissement de sa croissance. Il paraît donc évident que la notion actuelle de poids de naissance inférieur à 2 500 g ou inférieur au 10^{ème} percentile ne permet pas de définir objectivement un réel RCIU. Actuellement, les techniques de mesures cliniques ne permettent pas de faire la distinction entre deux nouveau-nés ayant un poids de naissance identique mais ayant suivi des courbes de croissance fœtales différentes.

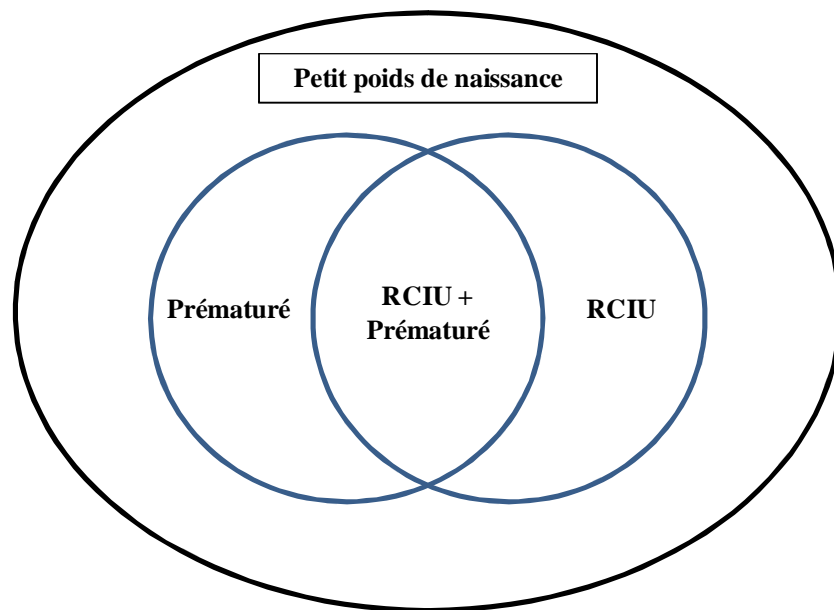


Figure 6 : Représentation schématique de la définition du petit poids de naissance.

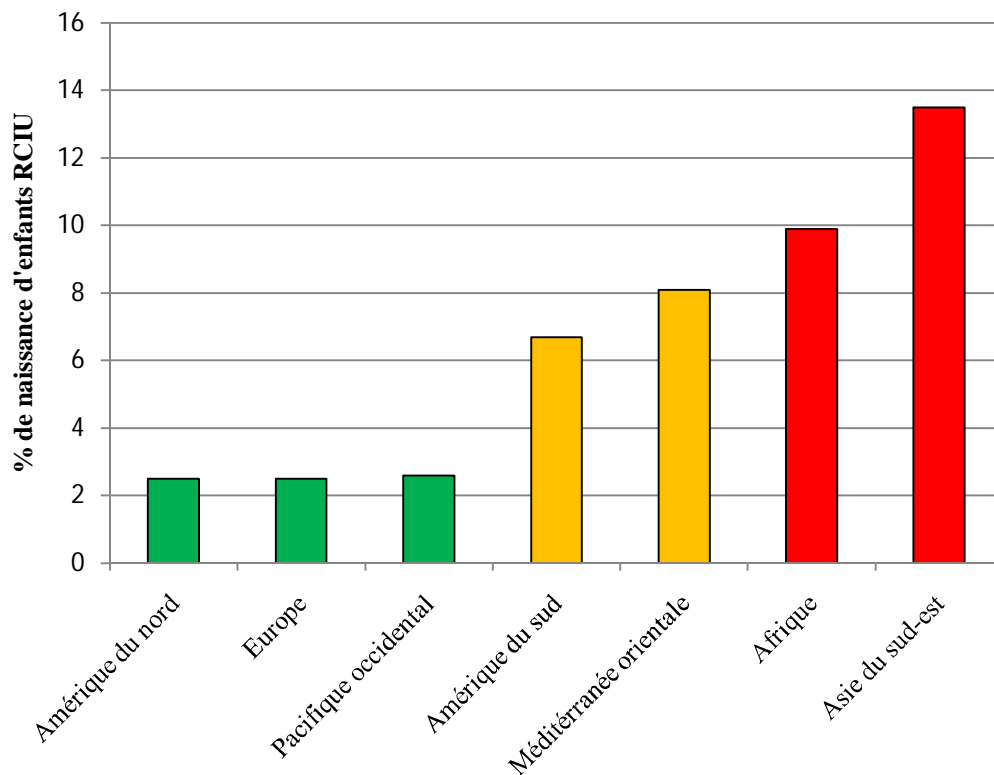


Figure 7 : Distribution géographique du RCIU. Adaptée de (Fishman *et al.*, 2004).

Chez le nouveau-né à terme, on distingue deux types de RCIU dépendamment de la période durant laquelle a eu lieu la perturbation de la croissance fœtale (Platz et Newman, 2008). Le RCIU de type I, dit "harmonieux", touche environ 20 % des fœtus présentant un RCIU. Celui-ci a une origine gestationnelle précoce (avant 24-26 semaines d'aménorrhée) et inclut des nouveau-nés symétriquement petits et dont les mesures biométriques de la tête, du squelette et de l'abdomen sont affectées proportionnellement. Le RCIU de type II, dit "disharmonieux", touche la majorité des naissances RCIU et possède une origine plus tardive (après 30-32 semaines d'aménorrhée). Il induit une diminution des mesures de la circonférence abdominale par rapport aux autres mesures biométriques. Ceci est dû principalement à une diminution des réserves énergétiques telles que le stockage du glycogène hépatique ou encore des dépôts de tissus adipeux. Ce type de RCIU est souvent associé à une insuffisance utéro-placentaire et à une redistribution de la circulation fœtale vers les organes vitaux, tandis que le RCIU harmonieux serait associé à une réduction du nombre total de cellules fœtales.

L'incidence du RCIU a été étudiée au niveau mondial par différents organismes. D'après une étude de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 1995 ; 23,8 % des nouveau-nés au niveau mondial sont touchés par un RCIU. Ce chiffre représente chaque année près de 30 millions de naissances dans le monde soit environ 70 000 cas par an en France (OMS, 2010). Un rapport de l'UNICEF de 2004 estime quant à lui que l'incidence du RCIU toucherait environ 15 % des naissances mondiales. De plus, il est important de signaler que les risques de développer un RCIU ne sont pas les mêmes suivant la localisation géographique (Figure 7). Ceux-ci sont faibles dans les régions développées comme en Europe, en Amérique du Nord et dans le Pacifique Occidental, tandis qu'ils sont très élevés dans les pays d'Asie du Sud-Est. Cependant, il est important de noter que ces estimations peuvent être faussées du fait du manque important de données fiables dans de nombreuses régions du monde notamment sur l'âge gestationnel des nouveau-nés (Fishman *et al.*, 2004).

b) Diagnostic du RCIU

Les moyens actuels ne permettent pas un diagnostic précoce et fiable du RCIU. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la seule mesure du poids de naissance n'est pas suffisante pour déterminer si le fœtus a subi ou non un RCIU.

i. Examen physique : mesure de la hauteur utérine

La mesure de la hauteur utérine est un examen utilisé en obstétrique qui permet d'estimer la croissance du fœtus au cours de la grossesse. Ce paramètre consiste en la mesure externe à l'aide d'un mètre-ruban, de la distance entre la symphyse pubienne, c'est à dire de l'articulation antérieure du bassin entre les os iliaques, et le fond utérin : la partie la plus haute de l'utérus. Son calcul est simple puisque qu'il suffit de multiplier le mois de grossesse par un facteur 4, ceci entre le 4^{ème} et le 7^{ème} mois. Puis à partir du 8^{ème} mois, il faudra soustraire le chiffre 2 à la valeur obtenue précédemment (Belizán *et al.*, 1978). Cependant, même si elle est faible, la mesure de la hauteur utérine n'est pas un indicateur fiable du RCIU puisqu'elle peut être également due à une erreur sur l'estimation de l'âge gestationnel ou encore à un oligoamnios, c'est à dire une quantité de liquide amniotique insuffisante. Des études ont estimé que cette technique n'est fiable que pour 41 à 86 % des cas dans la détection des enfants petits pour leur âge gestationnel. C'est pourquoi en cas de mesure anormale, une échographie est généralement réalisée.

ii. Mesure échographique

Dans le cadre de la surveillance normale de la croissance fœtale ou encore en cas de suspicion d'un RCIU, la biométrie fœtale par échographie est la technique la plus performante. Dans les grossesses normales, c'est le plus souvent l'échographie réalisée à 32 semaines d'aménorrhée qui permet de détecter un RCIU cliniquement méconnu, tandis que dans les grossesses à haut risque, le RCIU sera recherché dès la 26^{ème} semaine d'aménorrhée. Cependant, cette technique n'est pas sans défaut puisqu'elle est soumise à trois critères essentiels : une évaluation précise et exacte de l'âge gestationnel, du poids fœtal ainsi que l'utilisation de courbes de croissance de référence fiables (Platz et Newman, 2008).

Âge gestationnel

L'estimation de l'âge gestationnel est un paramètre important puisqu'il permettra de savoir si la croissance d'un fœtus est correcte par rapport aux courbes de référence. La mesure de ce paramètre ne pose généralement pas de problème puisqu'il se mesure à partir de la date des dernières règles. En cas de doute, des mesures échographiques peuvent être effectuées par des mesures de la longueur fœtale au cours du premier trimestre ou encore par la mesure du périmètre crânien durant le second trimestre. Par contre, à partir du troisième trimestre, il devient plus difficile d'estimer l'âge gestationnel du fait de la variabilité normale de la croissance des fœtus.

Estimation du poids fœtal

L'estimation du poids fœtal s'effectue par échographie par la mesure de différents paramètres biométriques, comme la taille de la tête, le périmètre abdominal ou encore la longueur du fémur chez le fœtus (Hadlock *et al.*, 1985). L'utilisation de ces paramètres séparément n'est pas suffisamment fiable pour estimer le poids du fœtus et généralement ces paramètres sont utilisés tous ensemble. Cependant, l'estimation du poids fœtal n'est fiable que pour des fœtus dont le poids est compris entre 1 500 et 4 000 g. En effet, en dessous de 1 500 g, les poids mesurés auront tendance à être surestimés, tandis qu'à l'inverse, les poids supérieurs à 4 000 g seront sous-estimés (Platz et Newman, 2008). Ces résultats suggèrent que les estimations actuelles du poids fœtal ne tiennent pas compte d'autres facteurs dont l'importance apparaît dans les cas extrêmes d'altération du poids fœtal. De plus, les erreurs potentielles dans la prise des mesures biométriques peuvent être nombreuses, ce qui peut aboutir *in fine* à des erreurs d'estimation d'environ 25 % entre la masse réelle et celle prédite (Manning *et al.*, 1981).

Courbe de croissance de référence

Les estimations de l'âge gestationnel et du poids fœtal obtenues précédemment sont utilisées ensemble pour déterminer la valeur du percentile auquel la croissance fœtale appartient, celles-ci permettront, dans le cadre de mesures successives, de détecter un éventuel "décrochage" de la courbe de croissance et donc de diagnostiquer une anomalie de la croissance fœtale. Il existe plusieurs courbes de croissance de référence qui permettent de

détecter ces croissances anormales. Cependant, le choix de la bonne courbe de croissance de référence à utiliser est essentiel puisque celle-ci peut être influencée par différents facteurs notamment la taille de l'échantillonnage, les caractéristiques maternelles, la parité, ou encore le sexe de l'enfant. Certaines courbes de croissance ont également inclus des données provenant de poids de naissance d'enfants prématurés alors que leur croissance peut être potentiellement altérée. De même, les grossesses multiples nécessitent des courbes de croissances spécifiques. La première courbe de croissance utilisée est celle établie à Denver par Lubchenco (Lubchenco *et al.*, 1966). Bien que réalisée il y a 45 ans, cette courbe est encore actuellement utilisée malgré son faible échantillonnage ($n = 5635$) et l'augmentation du poids de naissance moyen observé depuis sa création. La courbe pédiatrique la plus utilisée en France est la courbe de Leroy-Lefort (Leroy et Lefort, 1971) mais il existe aussi d'autres courbes comme celle de Mamelle (Mamelle *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que le 3^{ème} percentile de la courbe de Leroy-Lefort se superpose presque parfaitement avec le 10^{ème} percentile de la courbe de Lubchenco. Cette différence peut s'expliquer en partie par le fait que la population étudiée par Lubchenco est établie à une altitude de 1 850 m, ce qui pourrait induire une légère hypoxie fœtale, diminuant potentiellement le poids de naissance dans cette population. C'est pourquoi l'utilisation en clinique d'une courbe adaptée à la population étudiée est d'une grande importance, avec une correction éventuelle à l'échelon individuel liée au sexe, à l'ethnie, aux paramètres maternels (IMC, taille, *etc.*) et obstétriques (grossesse multiple, prématurité, parité, *etc.*).

Au final, le cumul possible d'erreurs lors des échographies peut aboutir à la dégradation de la fiabilité du diagnostic d'un RCIU. Il existe également d'autres paramètres échographiques qui peuvent être utilisés pour détecter des altérations de croissance fœtale (Platz et Newman, 2008). Cependant, aucun d'entre eux n'est fiable à 100 %. Au final, de nombreuses naissances présentant un RCIU échappent encore au diagnostic prénatal.

c) Prise en charge du RCIU

Une fois le diagnostic du RCIU effectué, la prise en charge passe essentiellement par une surveillance intensive de la croissance fœtale puisqu'il n'existe pas de traitement médicamenteux du RCIU. Le but étant de poursuivre l'accouchement au maximum pour éviter une trop grande prématurité tout en limitant le risque de mortalité et de morbidité fœtale.

Des mesures échographiques sont répétées toutes les 2 à 3 semaines afin d'évaluer la cinétique du RCIU car c'est la cassure de la courbe de croissance qui doit être identifiée plutôt que la position du poids fœtal par rapport à un percentile minimal (Haute Autorité de Santé, 2009). L'appréciation de la sévérité du RCIU s'effectue en fonction du terme de survenue (RCIU plus sévère s'il est précoce), de la biométrie (importance entre infléchissement ou arrêt de la croissance), du caractère harmonieux ou disharmonieux et de la vitalité du fœtus. Après la 34^{ème} semaine d'aménorrhée, le déclenchement de l'accouchement peut être effectué par voie basse ou encore par césarienne si le maintien de la grossesse ne permet plus d'améliorer de façon significative la survie du nouveau-né. Une corticothérapie peut ainsi être administrée afin de limiter les complications néonatales liées à la prématurité jusqu'à la 36^{ème} semaine d'aménorrhée.

L'analyse du rythme cardiaque fœtal constitue actuellement la méthode de référence utilisée pour décider du meilleur moment pour extraire un fœtus RCIU. Le score biophysique de Manning peut également être calculé. Ce score consiste en la recherche de la présence de différents paramètres comme la quantité de liquide amniotique, les mouvements respiratoires, le rythme cardiaque fœtal, le tonus et les mouvements fœtaux.

Ces grossesses vont également être suivies par des examens doppler (Mari et Picconi, 2008). Le doppler utérin consiste à explorer les artères utérines droite et gauche. La mise en évidence d'un index de résistance élevé est un facteur de mauvais pronostic périnatal car il témoigne de perturbations des échanges materno-fœtaux. Un doppler de l'artère ombilicale peut être également effectué afin de distinguer les véritables cas de RCIU qui nécessitent une surveillance étroite, des fœtus constitutionnellement petits auxquels le doppler ombilical sera normal et dont la surveillance pourra être allégée. Lors d'une hypoxie chronique, le fœtus redistribue son débit sanguin pour privilégier les organes les plus importants comme le cerveau, aux dépens du reste du corps. C'est pourquoi une mesure doppler au niveau de l'artère cérébrale moyenne peut être réalisée afin de détecter une diminution de l'indice de résistance de cette artère. On peut également confronter l'indice de l'artère cérébrale moyenne à celui de l'artère ombilicale dans ce que l'on appelle l'index cérébro-placentaire. Lors d'un RCIU, on observe une inversion de cet index en raison de la diminution de l'indice de résistance de l'artère cérébrale et de l'augmentation de l'indice de résistance de l'artère ombilicale.

Tableau 4 : Incidence du statut nutritionnel maternel sur le développement du RCIU. Adapté de (Fishman *et al.*, 2004).

Région	Paramètres féminins avant grossesse		Paramètres à la parturition		
	IMC ♀ de 15 à 44 ans (kg/m ²)	% de ♀ avec un IMC ≤ 20 kg/m ²	% de RCIU	% de RCIU attribuable à IMC ≤ 20 kg/m ²	% de mortalité néonatale attribuable au RCIU
Afrique	21,7	34,5	9,9	21,5	33,1
Amérique du nord	25,0	22,3	2,5	15,1	11,1
Amérique du sud	24,8	13,7	6,7	9,8	25,0
Europe	24,3	17,5	2,5	12,4	11,2
Méditerranée orientale	23,4	28,5	8,1	18,2	27,4
Pacifique occidental	22,0	31,4	2,6	20,0	11,5
Asie du sud-est	20,9	38,8	13,5	22,9	35,8

d) Étiologie du RCIU

Les origines du RCIU sont multiples et peuvent avoir une cause fœtale, maternelle ou placentaire (Saenger *et al.*, 2007). Cependant, dans 30 % des cas, les causes de ce retard restent inconnues.

i. Origines maternelles

Statut nutritionnel maternel

Dans les pays en voie de développement, la dénutrition calorique maternelle ainsi que la malnutrition sont à l'origine d'une part importante de la survenue d'un RCIU (Tableau 4). L'influence de la nutrition maternelle sur le développement fœtal est complexe et dépend de l'âge gestationnel durant lequel a lieu la malnutrition. En effet, une dénutrition avant la 26^{ème} semaine de gestation semble aboutir à un RCIU harmonieux, tandis qu'au delà de ce stade, on observe un RCIU disharmonieux. Le statut socio-économique de la mère a également été démontré comme facteur de risque de la survenue du RCIU. Cependant, il est possible que cet effet soit lié, du moins en partie, au statut nutritionnel maternel (Wilcox *et al.*, 1995 ; Hendrix et Berghella, 2008). Il est également important de noter que la dénutrition n'est pas seulement due à une restriction alimentaire mais aussi du fait de nausées et vomissements importants qui peuvent persister au-delà du 1^{er} trimestre (Snell *et al.*, 1998). De même, comme il a été indiqué précédemment la grossesse chez des adolescentes va entraîner une compétition énergétique entre la mère et son enfant résultant en une incidence accrue d'apparition d'un RCIU (King, 2003). L'impact du statut nutritionnel maternel est donc particulièrement plus important et pourrait agir fortement sur les mécanismes épigénétiques et hormonaux régulant la croissance fœtale, mais aussi sur le développement et le fonctionnement du placenta (Belkacemi *et al.*, 2010).

Atteintes toxiques

Le tabagisme est un facteur de risque important du RCIU. L'incidence du tabagisme sur le RCIU est liée à sa fréquence et à son intensité, il est de 17,7 % chez les femmes fumant durant toute la grossesse (Haute Autorité de Santé, 2009). De plus, les effets néfastes du tabac peuvent également être liés à un tabagisme passif (Geary *et al.*, 1997). Ainsi, il est estimé que

le tabagisme réduit le poids de naissance de 13 g par cigarette fumée par jour (Anderson *et al.*, 1984). En France, on estime que 37 % des femmes sont fumeuses avant leur grossesse, et que 20 à 28 % d'entre-elles continuent de fumer durant une partie ou la totalité de leur grossesse (Haute Autorité de Santé, 2009).

La consommation d'alcool est également un facteur de risque de survenue du RCIU d'autant plus qu'il est souvent associé à une consommation d'autres toxiques et à un environnement socio-économique défavorable. Les risques pour le fœtus sont importants puisqu'ils peuvent entraîner un syndrome d'alcoolisme fœtal dont les conséquences neurologiques et développementales sont importantes. En France, entre 700 à 3 000 naissances étaient concernées par ce syndrome en 2001, environ 23 % des femmes déclarent avoir consommé de l'alcool durant le 3^{ème} trimestre de leur grossesse (Haute Autorité de Santé, 2009). Ceci est d'autant plus alarmant qu'une étude a montré que la consommation d'un à deux verres de boisson alcoolisée par jour a une incidence notable sur le poids de naissance sans pour autant entraîner un syndrome d'alcoolisme fœtale à la naissance (Mills *et al.*, 1984).

Enfin, la consommation de drogues par la mère est également responsable d'un RCIU. De plus, la consommation de drogues est fréquemment accompagnée d'une consommation de tabac, d'alcool et d'une alimentation souvent négligée. Il est estimé que l'utilisation de cocaïne et d'héroïne ont une incidence respective de 30 et 50 % sur la survenue du RCIU (Naeye *et al.*, 1973); (Fulroth *et al.*, 1989). Bien que peu fréquentes, ces grossesses sont à risque car souvent associées à une naissance prématurée des enfants et à un syndrome de sevrage du nouveau-né.

Pré-éclampsie

La pré-éclampsie est une pathologie qui apparaît dans la seconde moitié de la grossesse et qui est caractérisée par une hypertension artérielle combinée à une protéinurie. Sa prévalence est estimée entre 5 à 6 % des grossesses (James et Nelson-Piercy, 2004). La pré-éclampsie va être à l'origine d'une augmentation de la résistance au niveau de l'artère utérine entraînant une diminution du flux sanguin placentaire et des échanges fœto-maternels. Ces altérations augmentent le risque de RCIU qui touche environ 30 % des grossesses pré-éclamptiques (Haute Autorité de Santé, 2009).

Pathologie maternelle et autres

L'hypertension artérielle maternelle, qu'elle soit préexistante ou gravidique, va avoir une incidence sur le développement fœtal. Leur prévalence est estimée respectivement à 0,4 % et 7 % des grossesses (Haute Autorité de Santé, 2009). Les deux principaux risques fœtaux liés à l'hypertension artérielle maternelle sont un accouchement prématuré dans 12 à 34 % des cas et un RCIU dans 8 à 15 % des cas. Bien que plus rare, la présence d'une néphropathie chronique antérieure à la grossesse va également être responsable d'un RCIU dans 25 % des cas dans le cadre d'une néphropathie légère (grade 1) et peut atteindre 90 % si la mère est dialysée (Haute Autorité de Santé, 2009). Enfin, le nombre de femmes enceintes en âge de procréer ayant eu recours à la chirurgie bariatrique, dans le but de perdre du poids, a augmenté de manière très significative au cours des dernières années. L'incidence de ces chirurgies de type : anneau gastrique ou encore dérivation gastrique, reste encore peu étudié mais semble cependant diminuer le poids de naissance (Granström *et al.*, 1990 ; Santulli *et al.*, 2010).

ii. Origines fœtales

Aberrations chromosomiques, génétiques et malformations

Ces aberrations constitueraient 5 à 20 % des origines du RCIU (Hendrix et Berghella, 2008). On retrouve dans cette catégorie de nombreuses pathologies comme les trisomies 21, 18 et 13, les délétions chromosomiques partielles comme le syndrome du "cri du chat" ou encore la perte totale d'un chromosome sexuel dans le syndrome de Turner. Des polymorphismes génétiques peuvent également avoir une incidence sur le RCIU comme par exemple la mutation C-1306T du gène de la métalloprotéinase matricielle MMP2 (Gremlich *et al.*, 2007), ou encore le polymorphisme rs2297660 du gène de la *low-density lipoprotein receptor-related protein 8* (Wang *et al.*, 2006). Les malformations congénitales sans altérations génétiques connues, comme les malformations cardiaques par exemple, sont également associées au RCIU (Khoury *et al.*, 1988).

Pathologies infectieuses

Les pathologies infectieuses sont responsables de plus de 10 % des cas de RCIU aux États-Unis (Hendrix et Berghella, 2008). Les principales pathologies sont regroupées sous l'acronyme "TORCH" pour *Toxoplasmosis, Other (Syphilis), Rubella, Cytomegalovirus and Herpes*. Dans les pays en voie de développement, le paludisme est responsable d'un RCIU chez 8 à 14 % des cas, principalement *via* une diminution de la capacité du placenta à répondre aux besoins nutritionnels du fœtus (Sullivan *et al.*, 1999); (Umbers *et al.*, 2011).

Grossesses multiples

Les grossesses multiples sont responsables d'environ 3 % des cas de RCIU. Ce chiffre est en constante augmentation du fait du développement croissant des procréations médicalement assistées (Hendrix et Berghella, 2008). Dans le monde, les grossesses gémellaires monozygotes ont une fréquence de 3 à 5 ‰, tandis que celles dizygotiques ont une incidence comprise entre 2 % et 5 ‰ suivant l'ethnie, l'âge maternel et la parité. Dans le cadre d'une grossesse gémellaire, le fœtus diminue sa croissance aux environs de la 28^{ème} semaine d'aménorrhée. Ce phénomène serait en partie dû à la contrainte maternelle. C'est pourquoi l'incidence du RCIU est de 14 à 25 % pour des jumeaux et de 50 à 60 % pour des triplets (Haute Autorité de Santé, 2009).

iii. Origines placentaires

Les origines placentaires du RCIU sont multiples et sont fortement liées à sa capacité à fournir au fœtus des quantités adéquates en oxygène et en nutriments. Plusieurs études ont montré une diminution de la densité vasculaire dans les placentas d'enfants RCIU, ce qui suggère une angiogenèse placentaire anormale en cas de RCIU (Chen *et al.*, 2002); (Mayhew *et al.*, 2004). Les causes exactes de ce dysfonctionnement ne sont pas connues mais semble impliquer des facteurs angiogéniques. En effet, l'expression du VEGF-A, un facteur pro-angiogénique, est diminuée dans les villosités placentaires d'enfants RCIU, tandis que l'expression de facteurs anti-angiogéniques tels que le VEGFR-1 est soit augmentée, soit

diminuée selon les cas (Regnault *et al.*, 2003 ; Arroyo et Winn, 2008). Le placenta peut également subir des infarctus dont les conséquences pathologiques sont plus ou moins graves suivant sa localisation et qui peuvent conduire à une ischémie par l'occlusion d'une partie de la circulation utéro-placentaire (Hendrix et Berghella, 2008). On peut également noter qu'une mauvaise implantation placentaire (*placenta prævia*) ou encore l'existence d'une seule artère ombilicale peuvent être des facteurs de risque du RCIU (Raio *et al.*, 2003).

e) Conséquences à court terme du RCIU

Le RCIU est à l'origine de complications à court terme sur le développement du nouveau-né mais aussi à plus long terme sur son état de santé, ce qui en fait un enjeu de santé publique majeur (Figure 8). Les complications immédiates du RCIU sont sévères. En effet, 52 % des enfants décédés de façon inexplicables *in utero* présentent un RCIU (Frøen *et al.*, 2004). Il est aussi corrélé avec une augmentation de la mortalité périnatale dont il représente la 3^{ème} cause avec 10 % des décès dans les pays développés après les pathologies liées aux malformations et à la prématurité (McIntire *et al.*, 1999 ; Friedlander *et al.*, 2003 ; Richardus *et al.*, 2003). Le RCIU est associé à des risques de morbidité néonatale comme l'asphyxie périnatale, signe de souffrance fœtale lors de l'accouchement, mais aussi de complications comme l'inhalation méconiale, une polyglobulie, des hypoglycémies, des hypocalcémies et des hypothermies (Kramer *et al.*, 1990 ; Rosenberg, 2008). À ces complications peuvent également s'ajouter celles retrouvées chez le nouveau-né prématuré, si l'accouchement a eu lieu avant la 37^{ème} semaine d'aménorrhée, comme les hémorragies cérébrales par exemple. Par la suite, des complications respiratoires et infectieuses peuvent survenir du fait de l'affaiblissement de leur système immunitaire. À un âge plus avancé, certains de ces enfants présentent un quotient intellectuel plus bas ainsi que des retards cognitifs tels que des troubles de la parole et du langage (Broekman *et al.*, 2009 ; de Bie *et al.*, 2010). Enfin, le RCIU est associé au développement d'autres pathologies chroniques à l'âge l'adulte et qui vont être détaillées dans la partie suivante.

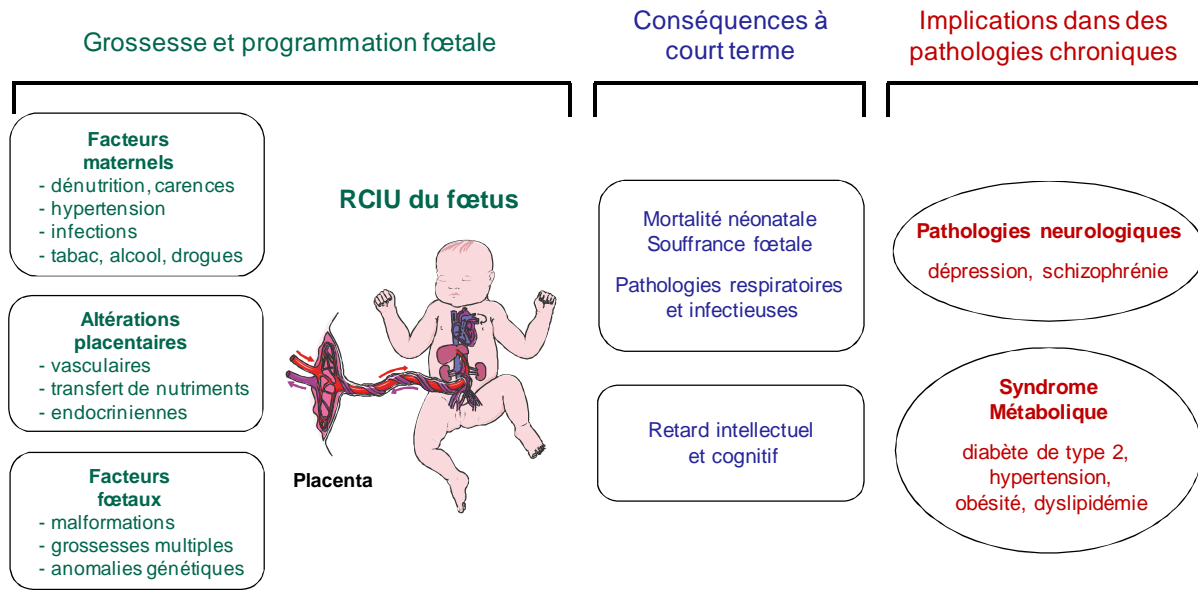


Figure 8 : Représentation schématique des différents facteurs et altérations aboutissant à un RCIU et leurs conséquences à court et long terme. Image du fœtus avec son placenta réalisée grâce à Servier Medical Art.

f) Conséquences à long terme du RCIU

Durant les dernières décennies, de nombreuses études épidémiologiques ont pu mettre en évidence qu'une altération de la croissance d'un fœtus, peut avoir des conséquences tout au long de sa vie future (Figure 9) notamment dans le développement de pathologies regroupées sous le terme de syndrome métabolique comme le diabète de type 2, l'hypertension artérielle ou encore l'obésité. Les premières études, montrant les conséquences du RCIU sur le développement de pathologies chroniques à l'âge adulte, ont débuté il y a une vingtaine d'années. Une première étude a permis de mettre en évidence une corrélation inverse entre un petit poids de naissance et le développement d'une hypertension artérielle à l'âge de 36 ans (Wadsworth *et al.*, 1985). Cette corrélation fut ensuite confirmée par l'épidémiologiste David Barker, qui a également montré l'incidence du poids de naissance sur la pression artérielle d'individus âgés de 10 et 36 ans, suggérant ainsi que la survenue de cette pathologie pourrait être en lien avec un environnement intra-utérin délétère (Barker *et al.*, 1989). Une autre étude a ensuite montré qu'une diminution du poids de naissance de 3 400 g à 2 500 g va induire une augmentation de la pression artérielle de 11 mmHg et que le poids du placenta est également inversement corrélé avec la pression artérielle (Barker *et al.*, 1990). Par la suite, le concept de programmation fœtale de pathologies chroniques à l'âge adulte a été étendu au développement du diabète de type 2. En effet, une étude réalisée au Royaume-Uni a montré que 40 % des personnes possédant un poids de naissance inférieur à 2 500 g seront plus vulnérables au développement de problèmes de tolérance au glucose et/ou au développement d'un diabète de type 2 (Hales *et al.*, 1991). Ces données furent également largement confirmées par d'autres études (Phipps *et al.*, 1993 ; Rich-Edwards *et al.*, 1999 ; Kyle et Pichard, 2006). Enfin, il semble que le poids de naissance a également une influence sur la morphologie à l'âge adulte. En effet, le poids de naissance est positivement corrélé avec la taille, le poids et l'IMC de l'individu à l'âge adulte (Figure 10) (Sørensen *et al.*, 1999 ; Loos *et al.*, 2001 ; Loos *et al.*, 2002). Cependant, en dépit de leur plus faible IMC, les individus présentant un poids de naissance plus petit ont tendance à présenter une masse musculaire réduite associée avec une adiposité abdominale et corporelle plus importante (Singhal *et al.*, 2003).

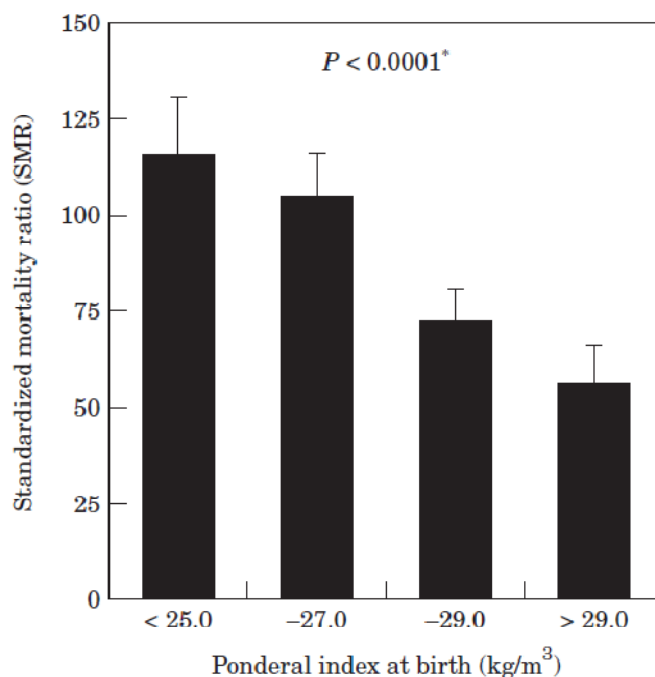


Figure 9 : Taux de décès par pathologies cardiovasculaires en fonction de l'IMC à la naissance à terme chez l'homme. D'après (Keith M., 2002).

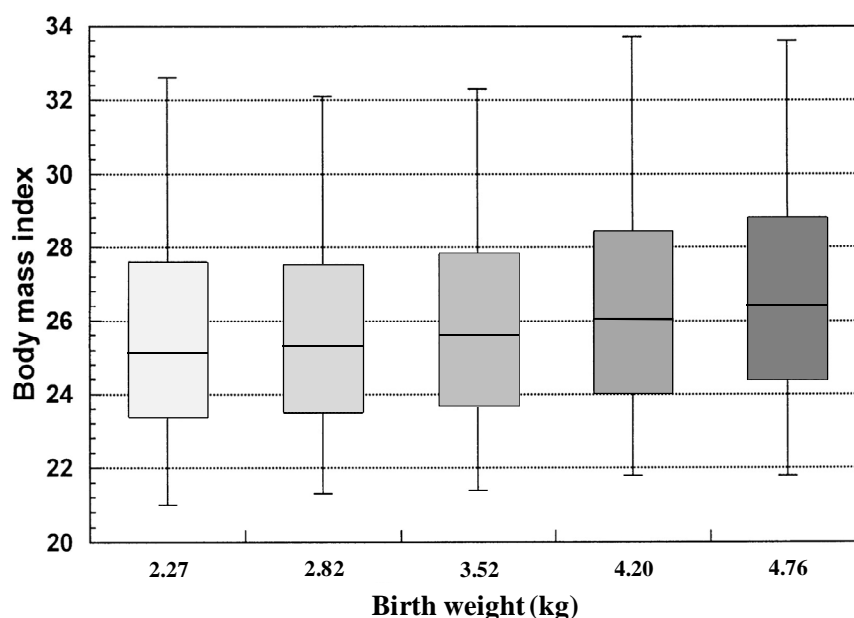


Figure 10 : Diagramme en boîte à moustache représentant la distribution de l'IMC chez des hommes de plus de 40 ans en fonction de leur poids de naissance. Les parties supérieures de la boîte et du segment correspondent respectivement au 75^{ème} et 95^{ème} percentile, tandis que les parties inférieures correspondent respectivement au 25^{ème} et 5^{ème} percentile. Adaptée de (Curhan *et al.*, 1996).

De ce constat est née l'hypothèse du phénotype d'épargne ou "*thrifty phenotype*" selon laquelle un environnement délétère *in utero* aboutissant à un RCIU va conduire à une programmation métabolique et endocrinienne du fœtus lui permettant de se développer et de survivre dans ces conditions particulières. Ce phénomène va cependant avoir des effets délétères à long terme lorsque l'organisme sera confronté à un environnement plus favorable et conduire au développement du syndrome métabolique (Hales et Barker, 1992). Les mécanismes potentiels aboutissant au développement de ces pathologies chroniques à l'âge adultes seront discutés par la suite.

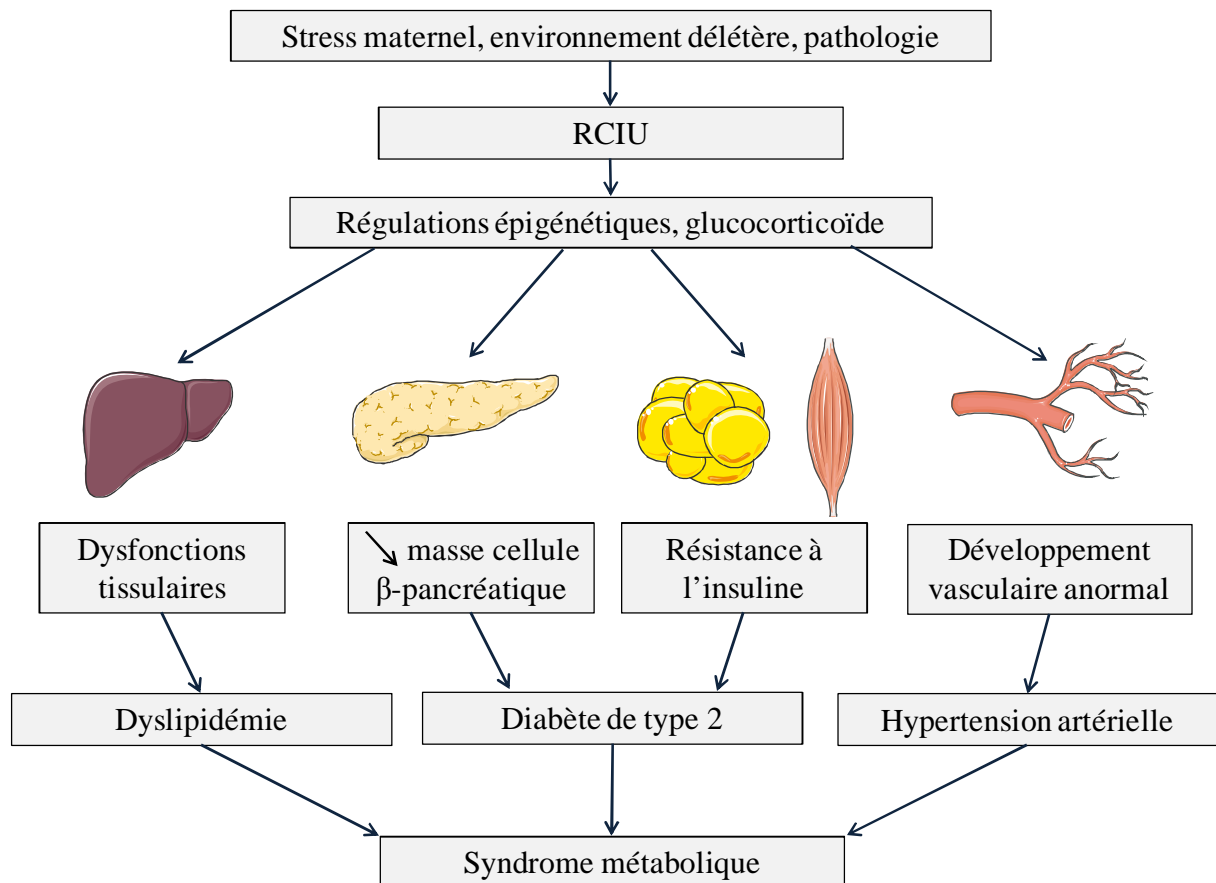


Figure 11 : Impact d'un RCIU sur le développement du syndrome métabolique.
Figure réalisée grâce à Servier Medical Art.

g) Mécanismes intervenant dans la programmation fœtale

Les mécanismes intervenant dans cette programmation sont peu connus, multiples et vont toucher différents organes (Figure 11). Il a ainsi été suggéré que les organes sont assujettis à une certaine plasticité durant leur développement et leur maturation. Ainsi, des conditions de croissance fœtale délétère vont affecter le développement des organes afin d'assurer la survie du fœtus à court terme. Cependant, cette plasticité va aboutir à des dysfonctionnements de ces organes à l'âge adulte lorsque les conditions de vie seront plus favorables. Dans cette partie, je vais prendre principalement pour exemple la programmation du pancréas pour expliquer deux des principaux mécanismes qui ont été décrits à ce jour. Comme nous l'avons vu précédemment, les mécanismes épigénétiques vont avoir un rôle important dans la croissance fœtale et des études ont montré que les fœtus atteints de RCIU ont un profil épigénétique modifié (Einstein *et al.*, 2010). Les effets phénotypiques de ces modifications épigénétiques ne sont pas délétères à court terme car elles vont favoriser la viabilité du fœtus. Cependant, ces effets peuvent être délétères lorsque ces modifications épigénétiques ne permettent plus une réponse normale à des stimuli environnementaux comme une alimentation riche en graisse par exemple. Ainsi, il a été démontré chez l'Homme que des dérégulations de la méthylation au niveau de promoteurs géniques, dans des cellules souches obtenues à la naissance, sont corrélées avec l'adiposité d'enfants âgés de 9 ans (Godfrey *et al.*, 2011). De même, il a été montré dans un modèle de ligature des artères utérines durant la gestation, des modulations de la méthylation de gènes pancréatiques connus pour être impliqués dans l'étiologie du diabète de type 2 (Thompson *et al.*, 2010).

D'autres études ont permis de mettre en évidence un rôle des glucocorticoïdes dans le RCIU et dans les mécanismes intervenant dans la programmation fœtale des pathologies de l'adulte (Edwards *et al.*, 1993 ; Cottrell et Seckl, 2009). Une exposition du fœtus à des taux importants de glucocorticoïdes va induire un petit poids de naissance et est associée à une tolérance au glucose réduite et à une hypertension artérielle (Edwards *et al.*, 1993 ; Lindsay *et al.*, 1996b ; Lesage *et al.*, 2001). Des études ont permis de montrer que les progénitures provenant de grossesses avec un RCIU ont une hypercortisolémie plasmatique et urinaire persistante ainsi qu'une stimulation de la sécrétion de cortisol plus importante après stimulation de l'axe corticotrope durant l'enfance et à l'âge adulte (Clark *et al.*, 1996 ; Levitt *et al.*, 2000). Par la suite, il a été démontré que ces taux élevés de glucocorticoïdes sont responsables d'une diminution du nombre de cellules β -pancréatiques (Blondeau *et al.*, 2001).

En effet, les glucocorticoïdes sont impliqués dans l'inhibition de facteurs de croissance, comme le *pancreatic and duodenal homeobox 1* (Pdx-1), au niveau des cellules précurseurs des cellules β -pancréatiques, ce qui va réduire leur nombre dans les pancréas des nouveau-nés RCIU (Dumortier *et al.*, 2007). Ces résultats ont été confirmés grâce à des études génétiques démontrant que la suppression du récepteur aux glucocorticoïdes de type 2 (ou GR) au niveau des cellules précurseurs du pancréas, induit une augmentation de la quantité de cellules β -pancréatiques (Gesina *et al.*, 2004 ; Valtat *et al.*, 2011).

Tableau 5 : Conséquences à long terme de la famine d'Amsterdam. Adapté de (Kyle et Pichard, 2006).

	Famine d'Amsterdam			Famine chinoise
	Exposition durant la gestation			Exposition
	Début	Milieu	Fin	Durant la gestation
Intolérance au glucose		x	x	x
Obésité	x			x
Pathologie cardiovasculaire	x			x
Profil lipidique athérogénique	x			x
Hypertension			x	x
Microalbuminémie		x		
Schizophrénie	x			x
Désordre affectif	x			

IV. Les modèles nutritionnels utilisés dans l'étude du RCIU et de la programmation fœtale.

Afin de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans la mise en place du RCIU et dans le développement de ses conséquences à court et long termes, les laboratoires ont développé de nombreux modèles d'études du RCIU chez différentes espèces comme les rongeurs, la brebis ou encore le cobaye. Ces modèles consistent en l'induction d'un "stress" chez la mère gestante résultant en une restriction de la croissance du fœtus. Différentes interventions stressantes sont utilisées en recherche. On peut ainsi trouver des modèles chirurgicaux de ligature des artères utérines, ce qui induit une réduction de l'afflux sanguin maternel vers le fœtus et va réduire les échanges fœto-placentaires (Nüsken *et al.*, 2008). Il existe également des modèles pharmacologiques comme l'administration de glucocorticoïdes de synthèse comme la dexaméthasone (Harris et Seckl, 2011). Enfin, différents modèles de manipulations alimentaires comme la restriction calorique, les carences en macronutriments (protéines, lipides, *etc.*) ou encore en micronutriments sont utilisées. Dans cette partie, je me focaliserai volontairement sur les modèles impliquant des altérations au niveau nutritionnel de la mère et/ou du fœtus. L'ensemble de ces modèles sont basés sur des données épidémiologiques concernant la grande famine d'Amsterdam qui a touché les Pays-Bas durant l'hiver 1944-1945 ou encore la famine en Chine de 1949 à 1951.

a) *Dénutrition et famine : données épidémiologiques*

Les principales études épidémiologiques concernant les famines d'Amsterdam et chinoise sont primordiales dans la compréhension des conséquences à long terme d'une dénutrition maternelle. Il est très intéressant de constater que ces études menées sur des populations issues d'ethnies différentes donnent des résultats similaires (Tableau 5). La famine d'Amsterdam a duré 5 mois, ce qui a permis de mettre en évidence l'importance de la fenêtre d'exposition de la dénutrition sur les conséquences de la programmation fœtale (Tableau 5). Lorsque l'exposition à la famine a eu lieu en milieu ou en fin de gestation, les individus présentent un poids et une taille à la naissance réduits, un poids placentaire diminué et une tolérance au glucose réduite à l'âge adulte (Stein et Susser, 1975 ; Ravelli *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 2010). Il semble également que la dénutrition maternelle ait des conséquences sur l'obésité. Cependant, les études chinoises et néerlandaises montrent toutes les deux un

dimorphisme sexuel. En effet, on observe une augmentation de l'IMC après l'âge de 50 ans chez la femme mais pas chez l'homme (Ravelli *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2010). La sous-nutrition maternelle prénatale est également liée à une augmentation du risque d'hypertension artérielle et de pathologies cardiovasculaires. Cependant, il semblerait que ce risque soit augmenté lorsque la dénutrition n'a eu lieu qu'en début de gestation et qu'elle est suivie par un retour à une alimentation normale (Roseboom *et al.*, 1999 ; Roseboom *et al.*, 2000b). Cet auteur a également pu mettre en évidence un profil athérogénique délétère chez la descendance de femmes gestantes dénutries sans pour autant que leur poids de naissance soit modulé (Roseboom *et al.*, 2000a). La restriction calorique augmente également le risque de développer un syndrome métabolique (Li *et al.*, 2011b). Bien qu'initialement décrit pour des pathologies métaboliques, le lien entre la restriction calorique *in utero* et le développement de pathologies neurodéveloppementales comme la schizophrénie a également été décrit dans ces 2 famines (Hoek *et al.*, 1998 ; St Clair *et al.*, 2005).

À ce niveau, il est intéressant de noter que d'autres données épidémiologiques provenant de la famine de Stalingrad n'ont pas réussi à montrer un lien clair entre la dénutrition prénatale et le développement d'une intolérance au glucose, une dyslipidémie, une hypertension ou encore de pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte (Stanner *et al.*, 1997). Cependant, cette famine a duré 28 mois et donc les personnes utilisées dans cette étude ont subi une dénutrition à la fois *in utero* et durant la petite enfance. Cette étude associée aux données montrant l'impact de la restriction calorique uniquement durant le début de gestation, met en évidence l'effet délétère du phénotype d'épargne et donc l'importance d'un rattrapage de la courbe de croissance pré- et postnatale, encore appelé "*catch-up growth*", sur la programmation de ces pathologies. Ces données semblent également être confortées par des études relatives à la famine chinoise qui ont montré une plus forte incidence du développement du syndrome métabolique lorsque la descendance dénutrie *in utero*, s'est nourrie avec un régime plus riche de type "occidental" durant l'âge adulte (Li *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2011b).

b) Impact de la dénutrition sur le développement fœto-placentaire

Dans cette thèse, je me suis intéressé à 2 différents modèles de dénutrition calorique maternelle durant la gestation chez le rat. Le premier appelé "modèle FR30" consiste en une réduction drastique de 70 % de la ration alimentaire maternelle quotidienne durant les 3 semaines de gestation. Le second se résume en une diminution de 50 % de la ration alimentaire uniquement durant la dernière semaine de gestation uniquement "modèle FR50". Bien que relativement similaire, ces 2 modèles ont des conséquences distinctes sur le développement fœto-placentaire. En effet, l'impact de la dénutrition dépend de la période, de la durée et de l'intensité de l'exposition. D'après les études provenant de la famine d'Amsterdam, les femmes sujettes à une dénutrition durant le dernier trimestre de la gestation vont donner naissance à des nouveau-nés avec des poids de naissance et placentaire réduits. Cependant, le ratio poids fœtal sur poids placentaire, un indicateur d'efficacité placentaire, n'est pas altéré. À l'inverse, la dénutrition durant le premier trimestre de gestation augmente le poids du placenta à la naissance, sans pour autant modifier le poids de naissance (Lumey, 1998). Ce résultat suggère que le placenta est capable de s'adapter à un environnement pauvre en nutriments afin d'assurer au maximum la croissance du fœtus. Cependant, ces effets sur le poids placentaire et fœtal seront irréversibles lorsque la dénutrition coïncide avec la période durant laquelle la croissance fœtale est maximale. Le poids du placenta est un mauvais indicateur de la fonction placentaire. C'est pourquoi, différentes études se sont donc intéressées à l'histo-morphologie placentaire puisque des changements au niveau des surfaces d'échanges fœto-placentaires peuvent avoir une forte incidence sur la croissance fœtale (Sibley *et al.*, 1997). Chez l'Homme, la restriction calorique réduit l'aire de la surface d'échange dans les villosités placentaires. Ces résultats ont été retrouvés chez le cobaye auquel une dénutrition légère durant la gestation réduit la surface d'échange et augmente de 40 % l'épaisseur de la barrière fœto-placentaire. L'ensemble de ces modifications a pour conséquences de diminuer les échanges fœto-maternels (Roberts *et al.*, 2001). D'autres études ont montré chez le rat, une augmentation de l'apoptose dans certaines zones placentaires comme le trophospongium et le labyrinthe dans le cadre d'une dénutrition calorique maternelle (Belkacemi *et al.*, 2009 ; Belkacemi *et al.*, 2011).

La dénutrition maternelle va également affecter l'expression et l'efficacité des transporteurs de nutriments qui participent aux échanges fœto-maternels. Il a, par exemple, été montré qu'une dénutrition de 50 % en fin de gestation chez le rat va diminuer

l'expression du transporteur de glucose GLUT3 (Lesage *et al.*, 2002). Cependant, ces études sont plutôt limitées car la plupart d'entre elles s'intéressent plutôt à l'expression des transporteurs de nutriments dans le placenta RCIU chez l'Homme sans qu'il y ait forcément un lien décrit avec la dénutrition. Comme nous l'avons vu précédemment, une exposition aux glucocorticoïdes diminue la croissance fœtale. Or la restriction calorique est vécue comme un stress à la fois chez l'Homme et chez le rat, ce qui augmente les glucocorticoïdes circulants maternels et ainsi contribue à l'impact de la dénutrition maternelle sur la croissance fœtale (Fichter et Pirke, 1986 ; Belda *et al.*, 2005). Le placenta va alors avoir un rôle prépondérant en limitant le passage des glucocorticoïdes maternels vers le fœtus, grâce à l'action de la 11 β -HSD2 qui agit comme une barrière en inactivant la corticostérone ou le cortisol en 11-dehydrocorticostérone et cortisone respectivement (Seckl, 1993). Cependant, il a été démontré que la dénutrition maternelle diminue l'expression de la 11 β -HSD2 placentaire en milieu de gestation chez la brebis et à terme chez le rat (Whorwood *et al.*, 2001); (Lesage *et al.*, 2001), ce qui va contribuer au développement du RCIU. Cet effet sera d'ailleurs amplifié par l'action des glucocorticoïdes sur le placenta, qui va diminuer, de façon dose dépendante, l'expression de ses transporteurs GLUT1 et GLUT3 (Hahn *et al.*, 1999).

c) Autres modèles d'altération nutritionnelle

Un certain nombre de modèles animaux ont été développés au cours des dernières années pour altérer la croissance du fœtus et étudier les mécanismes de la programmation fœtale. Les modèles les plus représentés concernent des modèles de malnutrition maternelle durant la gestation. Ces modèles ne sont pas à confondre avec les modèles de dénutrition calorique décrit précédemment puisqu'ils impliquent soit une carence soit à l'inverse une surabondance ciblées sur certains macronutriments (lipides, protéines, ...) ou certains micronutriments comme le fer par exemple. Ces modèles sont extrêmement intéressants puisque la malnutrition maternelle durant la gestation chez l'Homme est un problème important dans les pays en voie de développement. Parmi ceux-ci, le modèle de restriction protéique de 8 % au lieu de 20 % est l'un des plus utilisés. Chez le rat, ce modèle "*low protein*" diminue le poids de naissance à terme sans altérer la masse du placenta (Snoeck *et al.*, 1990). Malgré cette altération de croissance fœtale observée, ces animaux ne présentent

pas un spectre d'altérations physiologiques aussi marqué que celles observées dans les études épidémiologiques. En effet, ces animaux présente une masse corporelle similaire voire légèrement réduite tout au long de leurs vies ainsi qu'une diminution peu marquée de la prise alimentaire (Ozanne *et al.*, 1999 ; Petry *et al.*, 2000 ; Rees *et al.*, 2006). La progéniture du groupe "*low protein*" présente des altérations métaboliques. En effet, il a été montré que ces animaux ont une masse de cellules β -pancréatiques réduite qui s'explique en partie par une prolifération moins importante lors du développement de cet organe, une augmentation de l'apoptose, une augmentation du stress oxydatif et par des altérations mitochondriales (Petrik *et al.*, 1999 ; Theys *et al.*, 2009a ; Theys *et al.*, 2009b). Cependant, ces animaux à l'âge de 3 mois ne développent pas de résistance à l'insuline mais plutôt une sensibilité à l'insuline plus importante, ce qui conduit à une diminution de la sécrétion de cette hormone (Theys *et al.*, 2009a). Enfin, une étude a montré que ces animaux "*low protein*" ont une espérance de vie fortement réduite (Ozanne et Hales, 2004). Lorsque le régime "*low protein*" perdure jusqu'au sevrage et que les progénitures sont ensuite nourries avec un régime riche en graisses, ceux-ci vont avoir une tolérance au glucose moins importante (Wilson et Hughes, 1997). De même, un régime "*low protein*" induit durant la gestation chez des souris a permis de mettre en évidence une prédisposition à l'hypertension artérielle (Bol *et al.*, 2010).

D'autres laboratoires utilisent des modèles de malnutrition induite par un régime alimentaire riche en lipides. Ces études ont ainsi permis de montrer que ce type d'alimentation peut avoir un impact important sur le développement foeto-placentaire. Il a ainsi été montré que ce régime induit une augmentation de la masse placentaire en milieu de gestation chez la souris ainsi qu'une expression différentielle de certains gènes placentaires soumis à une empreinte parentale et potentiellement impliquées dans la croissance foeto-placentaire (Gallou-Kabani *et al.*, 2010). Ce type de régime va également avoir des conséquences plus directes sur le fœtus. Il a ainsi été montré une accumulation importante de triglycérides hépatiques pouvant conduire au développement d'une stéatose hépatique non alcoolique chez ces fœtus à terme ainsi qu'à une augmentation de la prolifération de neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, augmentant ainsi le risque d'obésité à l'âge adulte (Chang *et al.*, 2008 ; McCurdy *et al.*, 2009).

Bien qu'utiliser de façon plus disparate, d'autres modèles de carence en certains micronutriments durant la gestation ont été décrit dans la littérature. Il existe notamment des

modèles de carence maternelle en fer chez le rat, qui induisent un RCIU ainsi que la programmation d'une hypertension maternelle chez la progéniture à l'âge de 3 mois (Gambling *et al.*, 2002 ; Lewis *et al.*, 2002). Chez l'Homme, l'importance d'une supplémentation en vitamine C et en folate (vitamine B9) a également été montré pour avoir un impact positif sur le développement fœtale et sur son poids à la naissance (Mathews *et al.*, 1999 ; Fall *et al.*, 2003 ; Talaulikar et Arulkumaran, 2011). Cependant, l'impact d'une déficience en ces micronutriments sur le concept de programmation fœtale n'est pas encore clairement établie.

Comme dans les pays occidentaux, le RCIU est principalement causé par une insuffisance placentaire, des laboratoires ont développé un modèle de ligature bilatérale de l'artère utérine durant la dernière semaine de gestation chez le rat (Wigglesworth, 1964). Ce modèle a largement été utilisé pour étudier les conséquences du RCIU sur le concept de programmation fœtale. L'apparition de nombreuses conséquences au niveau du métabolisme glucidique ont été rapportée dans ce modèle (Simmons *et al.*, 2001 ; Styrud *et al.*, 2005). Cependant, une méta-analyse récente a permis de montrer de nombreux biais expérimentaux dans ce type de modèle. En effet, ce modèle ne semble pas avoir d'incidences sur le poids de naissance mais semble seulement diminuer le nombre de fœtus par portée (Neitzke *et al.*, 2008). De même, les perturbations métaboliques induites ne sont pas clairement établies puisque des dysfonctions au niveau du métabolisme lipidique ont été rapportées à la fois chez la descendance des mères ligaturées et celle des mères opérées sans ligature (groupe "*sham*") (Neitzke *et al.*, 2008).

Partie 1 : Recherche par analyse protéomique de protéines impliquées dans le RCIU

Maternal calorie restriction induces placental mitochondrial biogenesis, optimizes bioenergetic efficiency but alters ATP production: putative involvement of mitochondria in fetoplacental growth defects

Mayeur S., Lancel S., Theys N., Lukaszewski M.A., Duban-Deweer S., Bastide B., Hachani J., Cecchelli R., Breton C., Gabory A., Storme L., Reusens B., Junien C., Vieau D., Lesage J.

En préparation pour soumission à *Diabetes*

I. Objectif

Étant à l'interface entre l'homéostasie maternelle et fœtale, le placenta joue un rôle important dans le développement fœtal et constitue une cible importante dans l'étude des perturbations de la croissance fœtale. Cet organe est d'autant plus d'intérêt que de nombreuses études ont montré que des troubles du développement et de la morphologie placentaire sont associés à un risque accru de développer des pathologies cardiovasculaires et métaboliques à l'âge adulte. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, les techniques utilisées actuellement en médecine obstétrique ne sont pas suffisamment fiables pour détecter précisément les cas de RCIU. C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que le placenta est un organe privilégié dans la recherche de nouvelles voies impliquées dans les perturbations de la croissance fœtale et pourrait également être une source potentielle de nouveaux facteurs pouvant être utilisés comme marqueur plus fiable de diagnostic d'un RCIU.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé dans un premier temps un modèle de RCIU qui consiste en une diminution de 70 % de la ration alimentaire quotidienne des rates durant les 3 semaines de la gestation (modèle FR30). Ce modèle induit un RCIU important du fœtus associé à une diminution de la masse placentaire à terme. Ce modèle est également connu pour conduire, à l'âge adulte, à une hypertension artérielle modérée associée à une légère intolérance au glucose, une hyperleptinémie sans phénotype d'obésité et une hypercorticostéronémie (Rivière *et al.*, 2005 ; Breton *et al.*, 2009 ; Lukaszewski *et al.*, 2011).

Dans cette partie, nous avons étudié des placentas provenant du modèle FR30 par une approche protéomique (gel bidimensionnelle et spectrométrie de masse). Cette technique nous permet d'identifier de nouvelles voies protéiques impliquées dans le RCIU sans aucun *a priori* sur une famille protéique particulière. De façon surprenante, les principales modulations d'expression ont été observées pour des protéines mitochondriales, ce qui suggère un effet spécifique de la dénutrition maternelle et du RCIU sur ces organites. Puisqu'à ce jour, très peu d'études se sont intéressées à la physiologie des mitochondries dans le placenta, nous avons mené par la suite une étude moléculaire et fonctionnelle plus approfondie de ces organites dans les placentas FR30. L'ensemble de ces études fait l'objet d'un article en préparation rapporté ci-après.

Article en preparation

Maternal calorie restriction induces placental mitochondrial biogenesis, optimizes bioenergetic efficiency but alterates ATP production: putative involvement of mitochondria in fetoplacental growth defects

Sylvain Mayeur^{1,2}, Steve Lancel^{1,3}, Nicolas Theys⁴, Marie-Amélie Lukaszewski^{1,2}, Sophie Duban-Deweer^{1,5}, Bruno Bastide^{1,6}, Johan Hachani^{1,5}, Roméo Cecchelli^{1,5}, Christophe Breton^{1,2}, Anne Gabory⁷, Laurent Storme^{1,2}, Brigitte Reusens⁴, Claudine Junien⁷, Didier Vieau^{1,2}, and Jean Lesage^{1,2}

¹ Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille

² Unité Environnement Périnatal et Croissance, EA4489, Equipe dénutritions maternelles périnatales (Univ Lille 1), Bâtiment SN4, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

³ Department of Physiology, Faculty of Medicine, EA4484, IFR 114 IMPRT, Univ Lille 2, F-59000 Lille, France

⁴ Université Catholique de Louvain, Life Sciences Institute, Louvain-la-Neuve, Belgium

⁵ Laboratoire de Physiopathologie de la Barrière Hémato-Encéphalique, EA2465, IMPRT-IFR 114, Université d'Artois, F-62307 Lens Cedex, France

⁶ Activité Physique, Muscle et Santé, EA 4345, Univ Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

⁷ Biologie du Développement et Reproduction, UMR INRA-ENVA-CNRS, F-78352 Jouy en Josas, France

Running title: Placental mitochondria and fetal growth

Keywords : **proteomic, mitochondria, placenta, fetal growth, rat**

Corresponding author :

Professor Jean LESAGE, Unité Environnement Périnatal et Croissance, Equipe dénutritions maternelles périnatales, Université de Lille 1, Bâtiment SN4, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

Phone: +33- (0)320337722 ; Fax : +33- (0)320336349 ; E-mail : jean.lesage@univ-lille1.fr

ABSTRACT

OBJECTIVE – Being small size at birth from malnutrition is associated with an increased risk to develop type 2 diabetes and cardiovascular and metabolic diseases in adulthood. The placental capacity to supply adequate amount of nutrients and oxygen to the fetus represents one of the main determiner of the fetal growth. Despite its critical roles during prenatal development, few studies have investigated the effects of maternal diet on the placental physiology and functions. Our aim was to explore the placental adaptive proteomic processes implicated in response to a maternal suboptimal nutrition.

RESEARCH DESIGN AND METHODS – Rat term placentas from 70% food-restricted (FR30) mothers were used for a proteomic screen. Placental mitochondrial functions were evaluated using molecular and functional approaches and ATP production was measured.

RESULTS – FR30 drastically reduced both placental and fetal weights. FR30 placentas displayed 14 identified proteins differentially expressed, including several mitochondrial proteins suggesting specific alterations of these organelles. FR30 induced a marked increase of placental mtDNA content and changes in mitochondrial functions including modulation of the expression of numerous genes implicated in both mitochondrial biogenesis and bioenergetic pathways. Mitochondria under FR30 conditions showed higher oxygen consumption but fail to maintain their critical ATP production.

CONCLUSIONS – We provide first evidence that maternal suboptimal nutrition induces mitochondrial abnormalities in the placenta of growth-restricted fetuses. Although maternal calorie restriction induces mitochondrial adaptive processes such as an increase of both mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency; placental ATP production was drastically reduced. This disturbance may be implicated in reduction of the placental capacity to actively transport nutrients that may strengthen the effect of maternal undernutrition on the development of the fetus. Our data suggest that placental mitochondrial defects may be implicated, at least in part, in pathologies of feto-placental growth.

Introduction

Fetal growth and development are primarily dependent upon the nutritional, hormonal and metabolic environment provided by the mother (1). A wartime famine study in Holland first showed that a low food intake during pregnancy produces smaller size infants at birth (2). Growing evidence now indicates that being small size at birth from malnutrition is associated with an increased risk of developing type 2 diabetes (T2D), metabolic syndrome and cardiovascular disease in adulthood (3-5). However, the physiopathological effects acting *in utero* on the programming of the offspring's metabolic profile remain confused and may implicate numerous molecules and physiological systems. Fetal growth is a complex process that depends on the genotype and epigenotype of both the fetus and parents, the availability of nutrients and oxygen to the fetus and a variety of growth factors and proteins of maternal and feto-placental origin. However, along the pregnancy, the placental capacity to supply adequate amount of nutrients and oxygen to the fetus represents one of the main determiner of the fetal growth (6). Evidence is accumulating that the placenta is a programming agent for cardiovascular diseases (7-9). Because the placenta is the primary communication and nutrient acquisition organ for the fetus and presumably acts to maintain fetal homeostasis, it is also an appropriate organ to examine how differences in maternal food consumption are sensed by the developing offspring (9). Placental function follows a carefully orchestrated developmental cascade during gestation. Disruption of this cascade can lead to abnormal development of the placental vasculature of the trophoblast. Both its development and ongoing functions can be dynamically regulated by environmental factors including the maternal nutrient status (9,10). Because of the significant and increasing proportion of women eating inadequately during pregnancy and that such disturbance may compromise adult health in offspring, we urgently have to better understand how the placenta elaborates adaptative responses to maternal diet, potentially to offer advice and evidence-based dietary recommendations, clinical therapies and counselling to these women. In the present study, we investigated the ways in which maternal food-restriction might influence the placental proteome using a proteomic analysis of rat term placentas. In this study, we observed diet-specific differential expression of a limited number of placental proteins and, surprisingly, we noted that an important part of them were from mitochondrial origin. As few studies have investigated the physiology of mitochondria in the placenta before, we studied using molecular and functional analyses the effect of maternal undernutrition on these organelles. Our data provide novel evidence for a critical role of defective placental mitochondrial

function in the pathology of fetal-growth restriction associated to maternal suboptimal nutrition, suggesting that mitochondria in this organ may exert critical role in the fetoplacental development and putatively in the offspring's metabolic profile programming.

Research design and methods

Animal Model of Programming

Animal use accreditation by the French Ministry of Agriculture (no. 04860) has been granted to our laboratory for experimentation with rats. Experiments were conducted in accordance with the principles of laboratory animal care of the European Communities (European Communities Council Directive of 1986, 86/609/EEC). Adult virgin Wistar rats (280 g) were purchased from Janvier® (L'Arbresle, France) and housed (five per cage) with a controlled light cycle (12-h light/dark cycle, lights on at 07 am) and temperature (22 ± 2 C) with free access to standard rat chow (SAFE 04, 2900 cal/g, containing 16% protein, 3% fat, 60% carbohydrates; UAR, Augy, France) and tap water. After 14 days of acclimation, females were mated with a male for 1 night. Day 0 of pregnancy or embryonic day 0 (E0) was defined as the day immediately following the night during which males were present if spermatozoa were found in the vaginal smears. Pregnant females were transferred to individual cages, where they had free access to food and tap water. Two groups of pregnant rats were studied. In the control (C) group (n=9), dams were fed *ad libitum* during gestation (from E0 to E21). In the food-restricted group (FR30 group; n=9), females received from E0 to E21, 30% of the food-intake of control mothers, which has been previously determined in a series of pilot studies (FR30 females received 7.2 g/day of food from E0 to E21).

Plasma and Tissue Collection

At E21, mothers were rapidly weighed and killed by decapitation between 9 and 10 AM. The placentas and fetuses were collected by caesarean section, they were weighed and the sex was determined in fetuses. Experiments were conducted only on tissues from male fetuses. For each measurement, only a limited number of animals and placentas were chosen from each litter to obviate a putative litter effect. For fetal and placental parameters analysis, litters have been averaged for these parameters and then these averages have been

used for comparison between groups. Placentas were cut in two pieces by a median section and were frozen in liquid N₂ and stored at -80°C. Maternal and fetal blood glucose level was determined using a glucometer (Glucotrend 2, Roche Diagnostics) and samples were collected into cold tubes containing 5% EDTA solution and were centrifuged at 4,000 g for 10 min at 4°C. Plasma aliquots were stored at -20°C. Metabolic parameters (triglyceride and cholesterol plasma levels) were obtained using an automatic biochemistry analyzer (VetTest; IDEXX).

Sample preparation for two-dimensional analysis

Nine half frozen placentas from each litter and group were individually processed by grinding with a mortar and pestle cooled with liquid nitrogen. Frozen powders from each individual placenta were pooled and thawed by adding 800 µl of cold lysis buffer (0.3% SDS, 1X Protease inhibitor mix (Amersham Bioscience) and 50 mM Tris at pH 7.4) and sonicated in an ice bath for 30 sec (Vibracell; Sonics & Material Inc.). Sonicated solutions were centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. Supernatants solutions were collected and treated 30 min at 30°C with 100 units of Benzonase nuclease (E8263; Sigma-Aldrich). Tubes were centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and protein concentrations in the extracts were measured in triplicate using a Bradford-based protein assay (Dc protein assay; Bio-Rad) with BSA as the standard.

Two-Dimensional gel electrophoresis

Placental tissue lysates were pooled (nine from each group of subjects). For the first-dimension separation, 500 µg of sample protein were diluted in a total of 500 µl of buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 10mM DTT, 0.2% carrier ampholytes) and loaded onto an immobilized pH gradient (IPG) strip (Immobiline Drystrip pH 3-10 NL, 18 cm; GE Healthcare) by overnight passive in-gel rehydration. Isoelectric focusing within the strips was performed at 20°C with an Ettan IPGphor system (Amersham) using a total of 80,000 V/h with a maximum of 8,000 V. For the second dimension separation, the IPG strips were soaked for 2 x 15 min in 5 ml of equilibration buffer (6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 1% DTT and 0.375 M Tris, pH 8.8) followed by 15 min in 5 ml of a second equilibration buffer (with 2.5% iodoacetamide substituted for 1% DTT) and positioned against 15% SDS duracryl gels in a Ettan DALTsix (GE Healthcare Life Sciences) 12 mA/ gel for 20 min then 45 mA/gel until the bromophenol blue dye front reached the bottom of the gel. Gels were fixed and resolved protein spots were visualized with silver nitrate stain.

Image analysis of two-dimensional gels

Image acquisitions were performed with a freshly calibrated Umax Scanner (Amersham Biosciences, Orsay, France) at 300 DPI using the Labscan 3.0 software. Digitized images were stored in the Tagged Image File format. Scanned images were compared using Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics, Durham, NC, USA) for detection of significantly regulated spots. Spot matching were performed automatically then manually, respectively. The software was programmed to select significant spots, ANOVA with $P < 0.05$ and cutoff spots significantly equal to/or higher than 1.4 folds difference. Only spots with significantly altered levels were excised for mass analysis.

In-gel trypsin digestion

Differentially expressed spots were excised manually. Destaining of excised pieces was performed by two 20-min washes with 1.6% sodium thiosulfate and potassium ferricyanate. Pieces were washed with water until gels were totally clear. Following dehydration with 100% acetonitrile, 10 μ l of 7.5 ng/ μ l sequencing grade trypsin (Promega) was added to the gel pieces for 5 min at 4°C. The supernatant was removed and pieces were incubated overnight at 37°C with 30 μ l of 20mM sodium bicarbonate pH 8. Supernatants containing tryptic peptides were extracted for protein identification.

MALDI-TOF/TOF analysis

The MALDI target plate (AnchorChip™, Bruker Daltonics) was covered with extracted peptides mixed up with α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid matrix (0.3 mg/ml in acetone:ethanol, 3:6 v/v). The molecular mass measurements were performed in automatic mode using FlexControl™ 2.2 software on an Ultraflex™ II TOF/TOF instrument and in the reflectron mode for MALDI-TOF peptide mass fingerprint (PMF) or LIFT mode for MALDI-TOF/TOF peptide fragmentation fingerprint (PFF). External calibration over a 1000-3200 mass range was performed using the $[M+H]^+$ monoisotopic ions of bradikinin 1-7, angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin, and adrenocorticotrophic hormone (clip 1–17 and clip 18–39) from a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics). Briefly, an accelerating voltage of 25 kV, a reflector voltage of 26.3 kV and a pulsed ion extraction of 160 ns were used to obtain the MS spectrum. Each spectrum was produced by accumulating

data from 800 laser shots. A maximum of four precursor ions per sample were chosen for LIFT-TOF/TOF MS/MS analysis. Precursor ions were accelerated to 8 kV and selected in a timed ion gate. Metastable ions generated by laser-induced decomposition (LID) were further accelerated by 19 kV in the LIFT cell and their masses measured in reflectron mode. Peak lists were generated from MS and MS/MS spectra using Flexanalysis™ 2.4 software (Bruker Daltonics). Database searches, through Mascot 2.3 (Matrix Science Ltd, London, UK), using combined PMF and PFF datasets were performed in the UniProt 2011_02 database *via* ProteinScape 2.1 (Bruker Daltonics). A mass tolerance of 75 ppm and 1 missing cleavage site for PMF and MS/MS tolerance of 0.5 Da and 1 missing cleavage site for MS/MS search were allowed. Carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine residues were also considered. Relevance of protein identities was judged according to the probability based Mowse score calculated with a *P* value of 0.05 ($P < 0.05$).

Western blot analysis

Proteins (30 µg) from the same placental tissue lysates as used for the two-dimensional gels were separated on 12% SDS-PAGE and transferred electrophoretically onto a nitrocellulose membrane. Blots were blocked with 5% skimmed milk in Tris-buffered saline solution containing 0.1% Tween-20 and probe with the following antibodies: goat anti-rat SLC25A23 (sc-162206; Santa Cruz Biotechnology), MitoProfile Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (MS604; Mitosciences), mouse anti- α -tubulin (T6199; Sigma-Aldrich) or rabbit anti-rat GAPDH (2118S; Cell signaling). Blots were incubated with primary antibody (SLC25A23, at 1:400 dilution; OXPHOS, at 1:1,000 dilution; α -tubulin at 1:2,000 dilution or GAPDH at 1:5,000 dilution), overnight at 4°C with gentle shaking and then incubated with secondary antibody (SLC25A23: anti-goat IgG peroxidase conjugate at 1:50,000 dilution (A5420, Sigma-Aldrich); OXPHOS and α -tubulin: goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate at 1:5,000 and 1:35,000 dilution respectively (172-1011, Biorad); GAPDH: goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate at 1:10,000 (172-1019, Biorad) for 1 h at room temperature. Blots were exposed using a chemiluminescent detection method (Western lightning plus ECL, Perkin Elmer). All blots were scanned and densitometric analysis was conducted using GS-800 Imaging densitometer and QuantityOne Software (Biorad). Expressions were normalized with both GAPDH and α -tubulin to ensure equivalent amounts of loaded proteins.

mtDNA measurement

A quarter of placenta was mixed with 1ml of lysis buffer (100 µg Proteinase K (Sigma-Aldrich); 100 mM Tris pH8; 0.2% SDS; 5mM EDTA and 200 mM NaCl) and incubated overnight at 55°C. Placentas were grinded by a potter and were centrifuged at 13,000g for 20 min at room temperature. Supernatants were collected and mix with phenol pH 8/chloroform (V/V). Tubes were centrifuged at 13,000g for 10 min at 18°C. Supernatants (150 µl) were collected and sodium acetate (0.1 V) with cold ethanol added to precipitate DNA. After 1 h on ice, tubes were centrifuged at 13,000g for 10 min at 4°C and DNA was dissolved with 50 µl of water. Quantification of mitochondrial DNA (mtDNA; mean of *mt-Co1* and *mt-Co2* genes) levels relative to nuclear DNA (nDNA; *Aplnr* gene) was performed using a quantitative PCR (qPCR) method. qPCR was performed with a SYBR Green technology (Roche) and a LightCycler480 (Roche) following the Table 1 and the manufacturer's instruction. Each sample was evaluated in duplicate. Analysis of DNA level was carried out using first the determination of the threshold cycle Ct for each reaction corrected by the efficiency. Then the delta Ct was calculated by subtracting the mean Ct of the calibrator from each value of Ct for each gene. The amount of target relative to a calibrator was computed by $2^{-\text{delta Ct}}$. A previous validation by determination of amplification efficiency for each target and calibrator genes and a confirmation that these efficiencies are comparable between genes have been performed.

Quantitative RT-PCR

Total RNAs were isolated, as previously described (11), from the second half of placenta used for the proteomic analysis, and real-time RT-PCR was performed with a Light Cycler 480 SYBR Green I master and a LightCycler480 (Roche) following the Table 1 and the manufacturer's instruction. Three different housekeeping genes (*Gapdh*, *Ppib* and *Hprt1*) were used for the normalization.

Placental mitochondria isolement and high-resolution respirometry

For high-resolution respirometry analysis, a new series of placenta from male fetuses was collected and selected in comparison with the data of the Table 1. For each mother, mitochondria isolation was performed on 2 pools of 2 selected placentas. For respiratory

Partie 1: Protéomique placentaire

measurement, each pools was measured on separate chambers at the same time. Each mean value was obtain from a total of n=8 control and n=6 FR30 mothers. For each litter, 2 different pools of placental mitochondria have been used and analyzed. For placental mitochondria isolation, all procedures were performed at 4 °C. Placentas were placed in isolation buffer A containing 300 mM sucrose, 5 mM TES, and 0.2 mM EGTA, pH 7.2. Placentas was then finely minced and homogenized by the use of a Kontes tissue grinder. After centrifugation (800g for 7 min), supernatant was centrifuged at 8800g for 7 min. Mitochondrial pellet was suspended in 1 ml of buffer A and centrifuged one more time at 8800g for 7 min. Protein concentration was determined according to the Bradford method. After centrifugation, mitochondrial pellet was suspended in buffer B pH 7.1 containing 100 mM sucrose, 20 mM HEPES, 1 mM KH₂PO₄, 20 mM Taurine, 3 mM MgCl₂.6H₂O, 60 mM K-MES, 0.5 mM EGTA and 1 g/l BSA-Fraction V.

For high-resolution respirometry, 2250 µg of protein from mitochondrial fraction were then measured at 25 °C in a two-chamber respirometer (Oroboros O2k oxygraph, Innsbruck, Austria) containing a total volume of 2 mL of buffer B. Then, respiration state 1 was first determined. Respiratory state 2 (without ADP) was determined with glutamate (10 mM) + malate (2 mM) + pyruvate (5 mM), which activate the Krebs cycle enzyme malate dehydrogenase providing NADH to the respiratory chain (complex I). Respiratory state 3 (coupled respiration) was determined in the presence of ADP (2.5 mM). Once the steady state was reached the quality of mitochondria was assessed using a cytochrome c test for intactness of the mitochondrial membrane (12). If membrane of mitochondria is damaged by excessive permeabilization, the endogenous cytochrome c can be released from inter membrane space and reduced respiration. In this case, addition of exogenous cytochrome c to the experimental chamber will markedly stimulate the respiratory rate. If the increase of oxygen consumption was greater than 10% after addition of 10 µM cytochrome c, experiments were excluded. The coupling of phosphorylation to oxidation was determined by calculating the respiratory control ratio (RCR) as the ratio state3/state2. Then, complex II was activated by succinate (10 mM) addition. Addition of FCCP (0.5 µM; a chemical uncoupling molecule) was after used for calculate the maximal respiratory capacity of the mitochondria. To measure the repiration starting from complexe II, Rotenone (0.5µM) was added to inhibit the complex I activity. To determine the capacity of cytochrome c oxidase (complex IV), Antimycin A (2.5 µM; an inhibitor of Complexe III) and TMPD 0.5 mM + ascorbate (2 mM) was used as

an artificial redox mediator that assists transfer of electrons from ascorbate to cytochrome *c*. In presence of ADP (2.5 mM) and antimycin A (5 μ M), maximal respiration was stimulated. As antimycin blocks electron transfer from complex III, the TMPD-related respiration rate may evaluate complex IV related maximal respiration rate, excluding complexes I, II and III activities. At the end of manipulation, sodium azide (1 mM) was added for inhibiting complex IV activity and calculating the complex IV related maximal respiration without auto-oxydation of TMPD-Ascorbate themselves. Analyses for palmitoyl carnithine experiment was performed from fresh mitochondrial enrichment by addition of 20 μ M of palmitoyl carnithine then coupled respiration was determined in the presence of ADP (2.5 mM). Rates of respiration are given in picomoles O₂ per second per milligram protein. Data acquisition and analysis were performed with Datlab4 software (Oroboros, Innsbruck, Austria).

Placental ATP and ADP measurements.

Placental ATP and ADP measurements were determined using the ATP Colorimetric/Fluorometric Assay kit (Abcam) and the ADP Colorimetric/Fluorometric Assay kit (Abcam). Measurements were performed with the fluorometric assay following the manufacturer's instructions on 30 μ g of the same frozen placenta used for proteomic analysis. ATP and ADP contents were measured in duplicate and were calculated per microgram of placenta.

Statistical analysis.

Results are reported as means \pm SEM. Statistical analyses were performed using one way ANOVA and post-hoc comparison Dunnett's test. A *P* value of less than 0.05 was considered as significant. Analyses were performed using SigmaStat software (Systat Software).

Results

Maternal and fetal parameters

At E21, the maternal FR30 regimen did not modify both litter size and sex ratio (Table 2). FR30 reduced maternal body weight by 39% ($P < 0.001$) and induced a fetal growth restriction of fetuses as reflected by decrease of both height and weight of E21 male fetuses (-9% and -29% respectively; $P < 0.001$). The placental weight was decreased (-25%; $P < 0.001$) without variation of the feto-placental ratio. Analysis of some maternal metabolic parameters such as plasma glucose, triglycerides and cholesterol levels were also decreased in FR30 rats. In FR30 fetuses, only the glycaemia was significantly decreased (-42%; $P < 0.001$).

Proteomic analysis of FR30 placentas

Protein profiles were analyzed using two-dimensional gel electrophoresis (2D-gel) coupled to mass spectroscopy to identify differentially expressed proteins. Figure 1.A shows a representative control 2D-gel profile. Comparative visual and software-guided analyses of these 2D-gels revealed 14 differentially expressed spots. These spots were excised, digested in-gel with trypsin, and then identified using MALDI-TOF/TOF. Table 3 is a list of differentially expressed proteins with their calculated fold change relative to control placenta, P values, both theoretical and experimental isoelectric point (pI) and molecular weight (MW), and subcellular location. As seen on the figure 1.B, except cytoplasm, it was particularly interesting that mitochondria are the most affected subcellular organelle by FR30 diet. Figure 1.C is a tridimensional view of the control and FR30 2D-gel in which decreased expression of one of the most affected mitochondrial protein (SLC25A23; -1.69 fold changes). To confirm proteomic data, differential protein expression of SLC25A23 were verified by western blotting analysis and showed similar result (-1.49 fold change; $P = 0.006$).

Mitochondrial DNA analysis and mRNAs and proteins expressions of factors implicated in biogenesis and bioenergetic pathways

The ratio of mtDNA to nuclear DNA in placentas from FR30 rats was strongly increased (+250%, $P < 0.001$) (Fig. 2A). To investigate the molecular factors responsible to this elevation, we performed an analysis of transcript expression of three factors implicated in mtDNA replication: Pgc1- α , Nrf1 and Tfam (Fig. 2B). We noted that maternal FR30 increased expressions of these three factors ($P < 0.01$; $P < 0.05$ and $P < 0.001$ respectively) but decreased Tfam ($P < 0.01$) mRNA expressions. The expression of several mitochondrial genes including mt-Co1 (-18%), mt-Co2 (+38%) and mt-ATP6 (-15%) were also modulated by FR30 regimen (Fig. 3A). However, proteins levels of NDUFB8, UQCRC2 and ATP5A1 were not significantly modulated in FR30 placentas (Fig. 3B).

Mitochondrial oxygen consumption determination

For high-resolution respirometry analysis, a similar placental mitochondrial quantity from both experimental groups was used under several conditions (Fig. 4). Under basal conditions (without addition of exogenous substrates and/or drugs), FR30 mitochondria displayed a higher oxygen consumption ($P < 0.01$; Fig. 4A) as well as after GMP addition to activate the complex I of the respiratory chain ($P < 0.05$; Fig. 4A). Under this condition, by adding ADP to the preparation, the mitochondrial respiration was also increased ($P < 0.05$; Fig. 4B) by stimulating the complex I but not by substrates of the complex II alone (Fig. 4B). Although there was no difference, the maximal respiration of FR group, using the uncoupling agent FCCP, was higher compared to control (Fig. 4B). The respiratory control ratio (RCR) was increased in FR30 placentas ($P < 0.05$; Fig. 4C). Similarly, by stimulating specifically the complex IV, a higher respiratory capacity of FR30 mitochondria was observed ($P < 0.01$; Fig. 4D). Finally, using the palmitoyl fatty acid as mitochondrial substrate, no difference was noted between experimental groups for both oxygen consumption under basal conditions and for RCR value (Fig. 4E and 4F).

mRNA levels of mitochondrial factors; ATP and ADP determinations

Placental expression of several uncoupling proteins (UCP1;2;3;4; and BMCP1 (UCP5) and two adenine nucleotide translocators (Ant1 and Ant2) was performed using qRT-PCR. mRNA for UCP2, UCP 3, UCP5, Ant1 and Ant 2 were detected. We found that UCP2 is the most expressed uncoupling proteins in the rat placenta. Placental mRNA level of UCP2 was reduced ($P < 0.05$; Fig. 5A), and that of adenine nucleotide translocators: Ant1 (+58%) and Ant2 (-38%) were also affected in the FR30 group (Fig. 5B). The whole amount of placental ATP was decreased by 51% in the FR30 group ($P < 0.001$; Fig. 5C). In contrast, ADP content was increased ($P < 0.05$) and the ATP/ADP ratio was drastically reduced (-70%) by maternal FR30 ($P < 0.01$; Fig. 5D & 5E).

Discussion

In the present study, maternal FR30 drastically reduced both fetal and placental weights at term demonstrating that maternal calorie restriction induces an intrauterine growth restriction (IUGR) in rats as it has been previously described with others maternal regimens using calorie/nutrient restrictions (10,11,13,14). To unravel the mechanisms of placental adaptation under this deleterious nutritional condition, we investigated the ways in which maternal food-restriction had influenced the placental proteome using a proteomic approach.

Protein profiles were analyzed using two-dimensional gel electrophoresis coupled to mass spectroscopy to identify differentially expressed proteins. Surprisingly, only 14 differentially expressed proteins were identified using MALDI-TOF/TOF analysis suggesting that the placental proteome remains poorly affected even when maternal diet is drastically reduced along the gestation. Excepted to the cytoplasm, we noted that the subcellular location of the most affected proteins was the mitochondrion. These data prompted us to investigate the changes in placental mitochondrial function induced by maternal FR30.

Few studies have investigated the physiology of mitochondria in the placenta in both rodents and human although these organelles play critical roles in both placental development and materno-fetal exchanges (15,16). Recently, it has been proposed that placental mitochondrial dysfunction could be present in cases of placental insufficiency and may be

critical in fetal programming of diseases (17). Another recent study, using both *in vitro* and *in vivo* approaches in mice has shown that a threshold of mitochondrial function is required for normal development, and despite developmental plasticity of the embryo, impaired mitochondrial function in the embryo affects subsequent fetal and placental growth (18). We investigated here using molecular and metabolic methods, the effect of maternal FR30 on placental mtDNA content, mitochondrial respiratory capacity and expression of several mitochondrial genes and proteins at term. We found that placental mtDNA content was strongly increased by maternal FR30 and that the gene expression of Nrf1, Tfam and PGC1 α , three genes strongly implicated in mtDNA replication (19,20), was also significantly increased. These data suggest that maternal calorie restriction may have increased mitochondrial biogenesis in the placenta as it has been largely reported in others tissues (21-23). Then, we postulated that these disturbances may change the expression of the mitochondrial genome, and indeed we found a disturbed gene expression of several mitochondrial genes including mt-co1, mt-co2 and ATP6. As mtDNA genes produce exclusively proteins of the respiratory chain, we looked for a putative defective mitochondrial bioenergetic efficiency in FR30 placentas using high-resolution respirometry analysis and ATP determination.

Under basal conditions, FR30 mitochondria displayed higher oxygen consumption. Such observation was also found after specific activation the Krebs cycle and stimulation of the complex I of the respiratory chain but not of the complex II alone. Similarly, by stimulating the complex IV, a higher respiratory capacity of FR30 mitochondria was observed. These data demonstrated that the coupling of phosphorylation to oxidation was increased in placental FR30 mitochondria and revealed that, under FR30 condition, the activity of the respiratory chain is increased by modulation of complex I and/or IV activities. However, using palmitoyl fatty acid metabolism as substrate, FR30 mitochondria did not display modulated respiratory capacity showing an absence of modified capacity to metabolism fatty acid. Altogether, our findings demonstrated that the efficiency of the mitochondrial respiratory chain was increased under FR30 condition potentially to maintain an adequate ATP production under this deleterious nutritional condition. In line with this concept, we found that the expression of UCP2, an uncoupling protein that reduces the ATP production (24), was reduced by FR30 and that the expression of the adenine nucleotide translocator Ant1 that transfer ATP from the mitochondria to the cytoplasm (25) was increased. Inversely, the expression of the adenine nucleotide translocator Ant2 was decreased

by FR30. As suggested in others tissues, Ant2 role would be to import into mitochondria ATP produced by the glycolysis, energy essential to several intramitochondrial functions, particularly to maintenance of the membrane potential (26). The reduction of Ant2 in FR30 placental cells may thus increase the availability of ATP in the cytoplasm to sustain metabolic activities. For the first time, we reported here using qRT-PCR, that several type of UCP proteins (*i.e.* UCP2, UCP 3 and UCP 5) and two types of Ant (Ant1 and Ant2) are expressed in the rat placenta. UCP2 seems to be the main uncoupling protein expressed in the rat placenta. In summary, FR30 triggers off molecular and metabolic mitochondrial adaptations in the placenta potentially to maintain the bioenergetic status in cells.

As for the measurement of mitochondrial respiratory capacity, we used a comparable amount of placental extract from both experimental groups (based on the same protein content); we assayed the whole amount of placental ATP to obtain the global ATP production under FR30 condition. We found that both ATP content and ATP/ADP ratio were drastically reduced in FR30 placentas showing that despite the previously described mitochondrial plasticity, an impaired ATP synthesis occurs at term in the placenta under maternal calorie restriction condition.

In conclusion, our study provides first evidence that maternal suboptimal nutrition induces mitochondrial abnormalities in the placenta of growth-restricted fetuses. Mitochondria in the placenta are implicated in numerous critical functions for the fetoplacental development such as adequate ATP production for placental growth and transplacental nutrients transfers, reduction of oxidative stress, control of cell apoptosis and production of steroid hormones (15,17,18,27). Thus, mitochondrial defects and reduction of ATP synthesis may contribute to a disturbance of the placental development and of its activity along the gestation that may strengthen the effect of maternal undernutrition on the fetoplacental unit development. We postulate that placental mitochondrial defects may result to a modified birth weight and/or an higher vulnerability to diseases in offspring. Indeed, the phenotype of the placenta was shown to predict later hypertension and coronary heart disease in human (28,29). In this line, we previously reported that adult FR30 rats develop several metabolic pathologies such as an arterial hypertension (30), as well as an altered food intake behaviour (31) and fat deposition (32). Finally, long-term mitochondrial dysfunctions may also persist in offspring as it has been demonstrated in pancreatic β -cells of adult rats exposed in utero to a low protein diet (33,34). Indeed, growing evidences suggest that mitochondrial

dysfunctions may be implicated in several chronic metabolic diseases such as type 2 diabetes (35), obesity (36) and vascular diseases (37).

Acknowledgments

This work was carried out with the financial support of the « ANR- Agence Nationale de la Recherche - The French National Research Agency » under the « Programme National de Recherche en Alimentation et nutrition humaine », project « ANR-06-PNRA-022 ». No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

References

1. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 2008;359:61-73
2. Barker DJ. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* 1997;13:807-813
3. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-580
4. Robinson S, Walton RJ, Clark PM, Barker DJ, Hales CN, Osmond C. The relation of fetal growth to plasma glucose in young men. *Diabetologia* 1992;35:444-446
5. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 1998;351:173-177.
6. Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine regulation of feto-placental growth. *Horm Res* 2009;72:257-265

7. Winder NR, Krishnaveni GV, Hill JC, Karat CL, Fall CH, Veena SR, Barker DJ. Placental programming of blood pressure in Indian children. *Acta Paediatr* 2011;100:653-660
8. Thornburg KL, O'Tierney PF, Louey S. The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. *Placenta*. 2010;31:S54-S59
9. Hochberg Z, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel JC, Boileau P, Le Bouc Y, Deal CL, Lillycrop K, Scharfmann R, Sheppard A, Skinner M, Szyf M, Waterland RA, Waxman DJ, Whitelaw E, Ong K, Albertsson-Wikland K. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocr Rev* 2011;32:159-224
10. Belkacemi L, Nelson DM, Desai M, Ross MG. Maternal undernutrition influences placental-fetal development. *Biol Reprod* 2010;83:325-331
11. Mayeur S, Silhol M, Moitrot E, Barboux S, Breton C, Gabory A, Vaiman D, Dutriez-Casteloot I, Fajardy I, Vambergue A, Tapia-Arancibia L, Bastide B, Storme L, Junien C, Vieau D, Lesage J. Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human. *Placenta* 2010;31:785-791
12. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965-976
13. Lesage J., Blondeau B., Grino M., Breant B. & Dupouy J.P. 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
14. McArdle HJ, Andersen HS, Jones H, Gambling L. Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats. *Placenta* 2006;27:S56-60
15. Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol* 2006;572:25-30

16. Jansson T, Myatt L, Powell TL. The role of trophoblast nutrient and ion transporters in the development of pregnancy complications and adult disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:521-33
17. Leduc L, Levy E, Bouity-Voubou M, Delvin E. Fetal programming of atherosclerosis: possible role of the mitochondria. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149:127-30
18. Wakefield SL, Lane M, Mitchell M. Impaired mitochondrial function in the preimplantation embryo perturbs fetal and placental development in the mouse. *Biol Reprod.* 2011;84:572-80
19. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 2011;93:884S-90
20. Wong LJ. Molecular genetics of mitochondrial disorders. *Dev Disabil Res Rev* 2010;16:154-62
21. Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E; CALERIE Pennington Team. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med* 2007;4:e76
22. Cerqueira FM, Laurindo FR, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, akt and mitochondrial biogenesis. *PLoS One* 2011;31:e18433
23. López-Lluch G, Irusta PM, Navas P, de Cabo R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* 2008;43:813-9
24. Yonezawa T, Kurata R, Hosomichi K, Kono A, Kimura M, Inoko H. Nutritional and hormonal regulation of uncoupling protein 2. *IUBMB Life* 2009;61:1123-31
25. Brenner C, Subramaniam K, Pertuiset C, Pervaiz S. Adenine nucleotide translocase family: four isoforms for apoptosis modulation in cancer. *Oncogene* 2011;30:883-95
26. Chevrollier A, Loiseau D, Stepien G. What is the specific role of ANT2 in cancer cells?. *Med Sci (Paris).* 2005;21:156-61
27. Sewer MB, Li D. Regulation of steroid hormone biosynthesis by the cytoskeleton. *Lipids* 2008;43:1109-15

28. Eriksson JG, Kajantie E, Thornburg KL, Osmond C, Barker DJ. Mother's body size and placental size predict coronary heart disease in men. *Eur Heart J* 2011;32:2297-303
29. Barker DJ, Osmond C, Thornburg KL, Kajantie E, Eriksson JG. The lifespan of men and the shape of their placental surface at birth. *Placenta* 2011;32:783-7
30. Rivière G, Michaud A, Breton C, VanCamp G, Laborie C, Enache M, Lesage J, Deloof S, Corvol P, Vieau D. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension* 2005;46:1169-74
31. Breton C, Lukaszewski MA, Risold PY, Enache M, Guillemot J, Rivière G, Delahaye F, Lesage J, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Vieau D. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:462-72
32. Lukaszewski MA, Mayeur S, Fajardy I, Delahaye F, Dutriez-Casteloot I, Montel V, Dickes-Coopman A, Laborie C, Lesage J, Vieau D, Breton C. Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301:548-59
33. Theys N, Bouckennooghe T, Ahn MT, Remacle C, Reusens B. Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297:1516-25
34. Reusens B, Theys N, Dumortier O, Goosse K, Remacle C. Maternal malnutrition programs the endocrine pancreas in progeny. *Am J Clin Nutr.* 2011 [Epub ahead of print]
35. Lu H, Koshkin V, Allister EM, Gyulkhandanyan AV, Wheeler MB. Molecular and metabolic evidence for mitochondrial defects associated with beta-cell dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2010;59:448-59
36. Leloup C, Casteilla L, Carrière A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Pénicaud L. Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:519-30
37. Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, Sowers JR. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl)* 2010;88:993-1001

Partie 1: Protéomique placentaire

Table 1: Parameters of the primers used for qRT-PCR

Gene	Primer		Amplification temperature (°C)	Amplicon size	Genbank
	Sequence (F)	Sequence (R)			
<i>Gapdh</i>	5'-TGA CTC TAC CCA CGG CAA GTT-3'	5'-CTT CCC ATT CTC AGC CTT GAC T-3'	60	52	NM_017008
<i>Ppib</i>	5'-TTT CGG CAA AGT TCT GGA AGG CA-3'	5'-CTT GCC ACA GTC TAC AAT GAT CAC A-3'	60	109	NM_022536
<i>Hprt1</i>	5'-GTG TCA TCA GCG AAA GTG GA-3'	5'-ATG GCC ACA GGA CTA GAA CG -3'	60	123	NM_012583
<i>Aplnr</i>	5'-CCT TCA TCA TCA TGC TGA CCT GTT A-3'	5'-GGT GGT AAG GCA TCC AGC ACA G-3'	64	159	NM_031349
<i>mt-Co1</i>	5'-ATC TAT AGG AGC AGT ATT CGC C-3'	5'-TGG GCT TTT GCT CAT GTG TC-3'	64	96	YP_665631
<i>mt-Co2</i>	5'-TGA GCC ATC CCT TCA CTA GG-3'	5'-TGA GCC GCA AAT TTC AGA G-3'	60	120	YP_665632
<i>Ppargc1a</i>	5'-AAT GCA GCG GTC TTA GCA CT-3'	5'-GTG TGA GGA GGG TCA TCG TT-3'	64	190	NM_031347
<i>Nrf1</i>	5'-CTC ACC CTC CAA ACC CAA CC-3'	5'-CCA GCG CAG ACT CCA GGT C-3'	60	110	XM_231566
<i>Tfam</i>	5'-AAG TGT TTT TCC AGC TTG GGT A-3'	5'-AAA CTT TTG CAT CTG GGT GTT T-3'	64	112	NM_031326
<i>mt-Nd4l</i>	5'-TCC CAA TTA CCA TTC TAG TTT T-3'	5'-AGG TTT TGT ACG TAG TCT GTT CCG T-3'	60	103	YP_665637
<i>mt-Atp6</i>	5'-TCG CTT CGC TTT GTA CTC TCT T-3'	5'-GGT CAG CAG TCT CTG TGC ATT T-3'	60	122	YP_665634
<i>Ucp1</i>	5'-AAG ACA GAA GGA TTG CCG AAA C-3'	5'-ACT GGG ACC TAC AAT GCT TAC A-3'	60	286	NM_012682
<i>Ucp2</i>	5'-CTC CCA ATG TTG CCC GAA A-3'	5'-GAG GTC GTC TGT CAT GAG GTT G3-	60	144	NM_019354
<i>Ucp3</i>	5'-GGG ACT TGG CCC AAC ATC ACA A-3'	5'-CCA CCA CCG TGG CAC AGA AAC C-3'	60	163	NM_013167
<i>Slc25a27</i>	5'- TTT TAG CCA ATC CAA CTG ACC TA-3'	5'-TAT TCA CCA GTG CTG CTC TTT GT-3'	60	186	NM_053500
<i>Slc25a14</i>	5'-GTT CCG CTT TAA GCC ATG AGA TG-3'	5'-CGA TAC TCT GAC CTT GGA CTT GC-3'	60	119	NM_053501
<i>Slc25a4</i>	5'-CCC TCT GCT TCG TCT ACC CAC TG-3'	5'-GGG CAA TCA TCC AGC TCA CAA TA-3'	60	273	NM_053515
<i>Slc25a5</i>	5'-GGA CTT CTT GGC TGG AGT GG-3'	5'-TAT CTG CCG TGA TTT GCT TGC TG-3'	60	116	NM_057102

Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Ppib* (CycloB), peptidylprolyl isomerase B; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Aplnr*, apelin receptor; *mt-Co1* cytochrome c oxidase I, mitochondrial; *mt-Co2*, cytochrome c oxidase II, mitochondrial; *Ppargc1a* (Pgc1- α), peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha; *Nrf1*, nuclear respiratory factor 1; *Tfam*, transcription factor A, mitochondrial; *mt-Nd4l*, NADH dehydrogenase 4L, mitochondrial; *mt-Atp6*, ATP synthase 6, mitochondrial; *Ucp1*, uncoupling protein 1; *Ucp2*, uncoupling protein 2; *Ucp3*, uncoupling protein 3; *Slc25a27* (Ucp4), solute carrier family 25, member 27; *Slc25a14* (Bmcp1), Brain mitochondrial uncoupling 1; *Slc25a4* (Ant1), solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4; *Slc25a5* (Ant2), solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5.

Table 2: Maternal and fetal parameters

	Control			FR30			P
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	
Maternal weight (g)	444	8	9	270	11	8	< 0.001
Maternal blood glucose (mmol/l)	4.87	0.20	9	4.02	0.17	8	0.008
Maternal blood triglycerides (g/l)	1.86	0.35	9	0.73	0.21	8	0.017
Maternal cholesterol (g/l)	0.771	0.099	9	0.564	0.049	8	0.011
Litter size	12.1	1.7	9	11.6	0.7	8	NS
Males/females ratio	1.01	0.18	9	1.10	0.13	8	NS
Fetal weight (g)	5.56	0.07	9	3.97	0.16	8	< 0.001
Fetal height (mm)	45.9	0.4	9	42.7	0.6	8	< 0.001
Fetal blood glucose (mmol/l)	7.44	0.78	9	4.33	0.52	8	0.027
Fetal blood triglycerides (g/l)	0.467	0.079	9	0.382	0.060	8	NS
Fetal blood cholesterol (g/l)	0.476	0.084	9	0.362	0.040	8	NS
Placental weight (mg)	592	17	9	443	19	8	< 0.001
Fetus/placenta ratio	9.44	0.25	9	9.06	0.54	8	NS

Table 3. List of identified proteins that were differentially expressed (> 1.4 fold ratio increased or decreased) between control and FR30 rat placenta.

Spot number	Protein name	Gene name ^a	Accession number ^a	<i>t</i> test ^b	Change fold ^b	pI ^c		MW (kDa) ^c		Seq Cov (%) ^d	PMF ^e	PMF matched		PFF matched		Subcellular location ^a
						T	E	T	E			PMF ^e	peptides	PFF ^f	peptides	
1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	<i>Ppia</i>	P10111	0.002	+3.71	9.40	9.02	17.9	19	72.0	87.4	11	58.0	3	Cytoplasm	
2	Peroxiredoxin-1	<i>Prdx1</i>	Q63716	0.009	+3.59	9.20	8.97	22.1	26	39.2	71.4	8	61.0	1	Cytoplasm	
3	Dextrin	<i>Dstn</i>	Q7M0E3	0.008	-2.25	8.19	8.41	18.5	21	16.5	-	-	98.0	2	Cytoplasm	
4	Glyoxalase domain-containing protein 4	<i>Glod4</i>	Q9CPV4	<0.001	-1.77	5.28	7.82	33.3	30	26.8	61.0	7	-	-	Mitochondria	
5	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-3	<i>Slc25a23</i>	Q6GQS1	0.009	-1.69	7.19	5.07	52.4	19	20.6	68.6	7	-	-	Mitochondria	
6	Proteasome subunit beta type-2	<i>Psmb2</i>	P40307	0.021	-1.65	7.70	8.02	22.9	26	32.8	90.4	9	-	-	Cytoplasm, nucleus	
7	Haptoglobin	<i>Hp</i>	P06866	0.008	-1.54	6.10	5.04	38.5	47	3.5	-	-	66.5	1	Secreted	
8	Activated CDC42 kinase 1	<i>Tnk2</i>	Q5U2X5	0.043	-1.54	7.35	6.04	115	23	16.9	62.5	13	-	-	Cell membrane	
9	Serotransferrin	<i>Tf</i>	P12346	0.011	-1.53	7.14	7.61	76.3	77	3.0	-	-	60.0	2	Secreted	
10	Malate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Mdh2</i>	P04636	0.041	-1.50	8.83	8.77	35.7	46	57.7	115	16	168	2	Mitochondria	
11	Peroxiredoxin-6	<i>Prdx6</i>	O35244	0.002	-1.49	5.64	6.37	24.8	27	33.5	83.0	10	-	-	Cytoplasm, lysosome	
12	Nesprin-2	<i>Syne2</i>	Q6ZWQ0	0.002	-1.49	5.23	7.90	782	36	7.7	61.0	46	-	-	Everywhere	
13	Actin, cytoplasmic 2	<i>Actg1</i>	P63259	0.017	-1.47	5.31	5.78	41.8	39	45.9	114	18	218	3	Cytoplasm	
14	Alpha-crystallin B chain	<i>Cryab</i>	P23928	<0.001	-1.40	6.90	7.78	20.1	24	43.4	92.0	11	138	3	Cytoplasm, nucleus	

^a Gene name, accession number and subcellular location according Uniprot. ^b Protein fold ratio between control and FR30 placenta. A negative number indicates an decreased expression in FR30 placenta. *P*-Value was calculated using the Student's *t*-test. ^c Isoelectric point (pI) and molecular weight (MW): Theoretical (T) and Experimental (E). ^d Sequence coverage. ^e Peptide mass fingerprinting (PMF). ^f Peptide fragment fingerprinting (PFF).

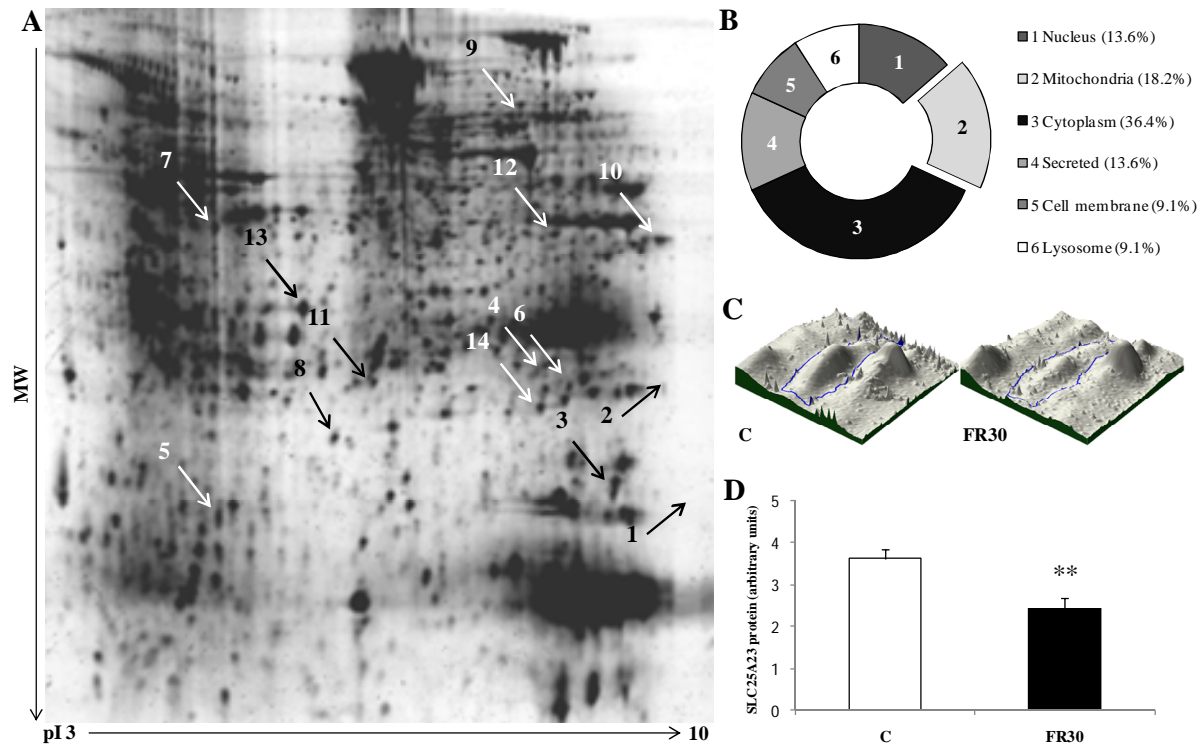


FIG. 1. Two-dimensional gel analyses of proteins from control and FR30 placenta. **A:** Representative images of 2D-gel of placental proteins profiles in rat separated by pI on a pH 3-10 gradient strip and then molecular weight on an 15% SDS-PAGE gel. The way of arrows indicate differential expression in FR30 group. **B:** Classification of differentially expressed proteins according their cellular localisation. **C:** This panel shows a representative quantitative 3D-view of the SLC25A23 protein (spot n°5) used for confirmation by western blotting. **D:** Confirmation of differential SLC25A23 expressions in control (n=7) and FR30 (n=7) groups by western blotting. **, $P < 0.01$ vs FR30 group.

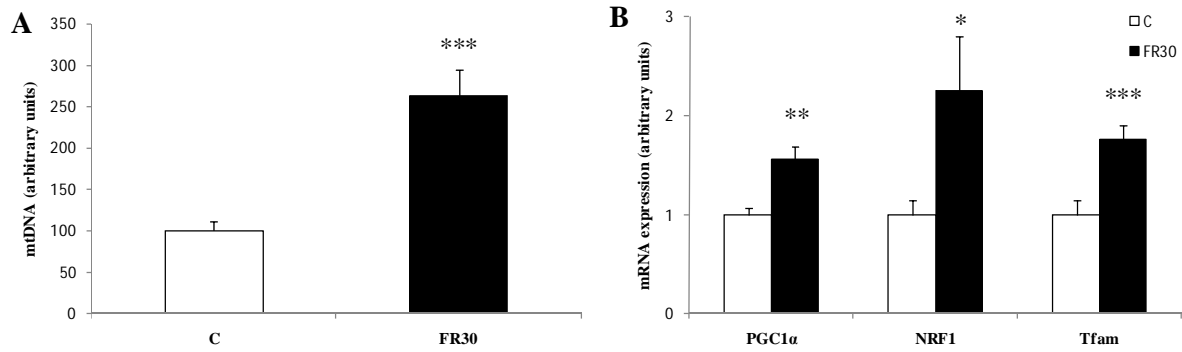


FIG. 2. Measurement of mitochondrial biogenesis indicators. **A:** Relative quantification of mitochondrial DNA (mtDNA) content by real-time quantitative PCR analysis in control (n=7) and FR30 (n=7) placenta. **B:** Relative quantification of PGC1 α , NRF1 and TFAM mRNA expression by RT-qPCR in control (n=8-9) and FR30 (n=9). *, $P < 0.05$ vs FR30 group. **, $P < 0.01$ vs FR30 group. ***, $P < 0.001$ vs FR30 group.

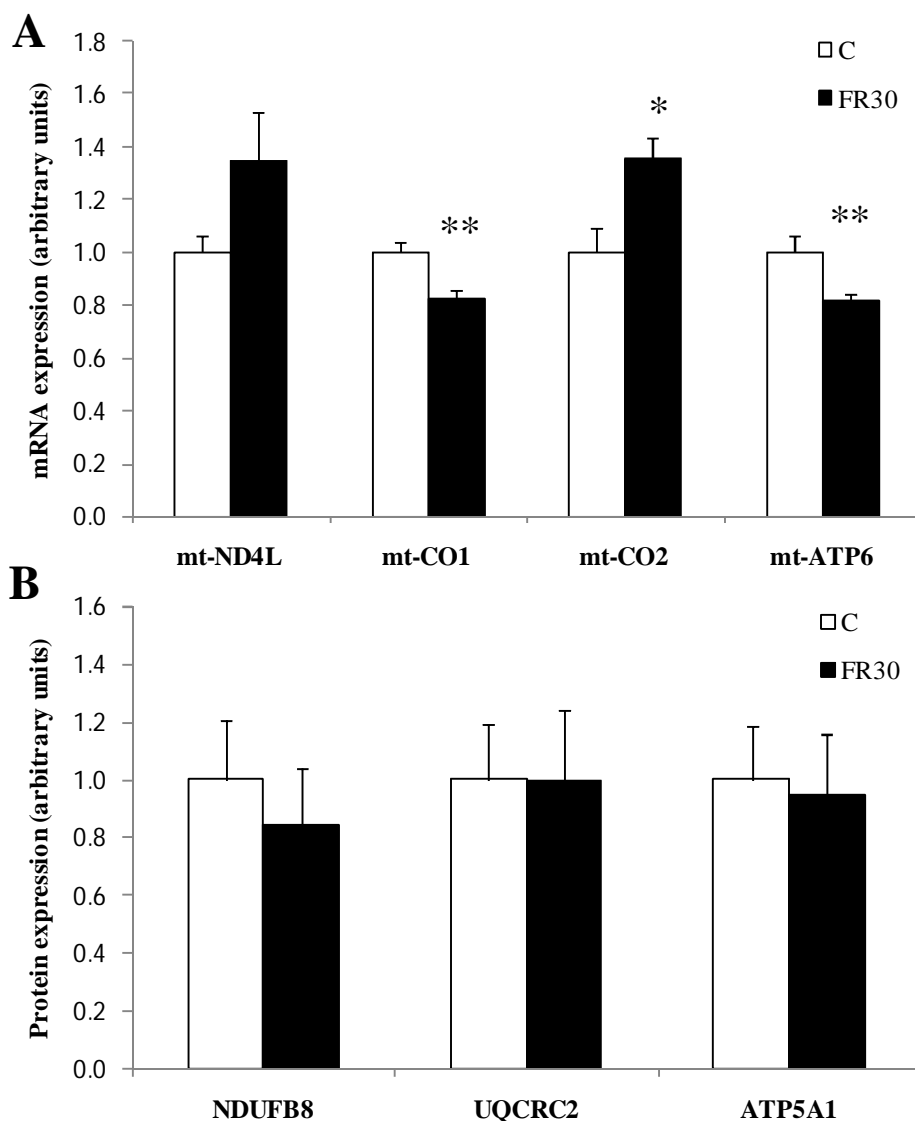


FIG. 3. Measurement of respiratory chain mRNA and protein expression. **A:** Relative quantification by RT-qPCR analyses of mRNA encoded by mtDNA (control: n=9; FR30: n=7-9). **B:** Relative expression of respiratory chain proteins encoded by nuclear DNA. (control: n=9; FR30: n=9). $P < 0.05$ vs FR30 group. **, $P < 0.01$ vs FR30 group.

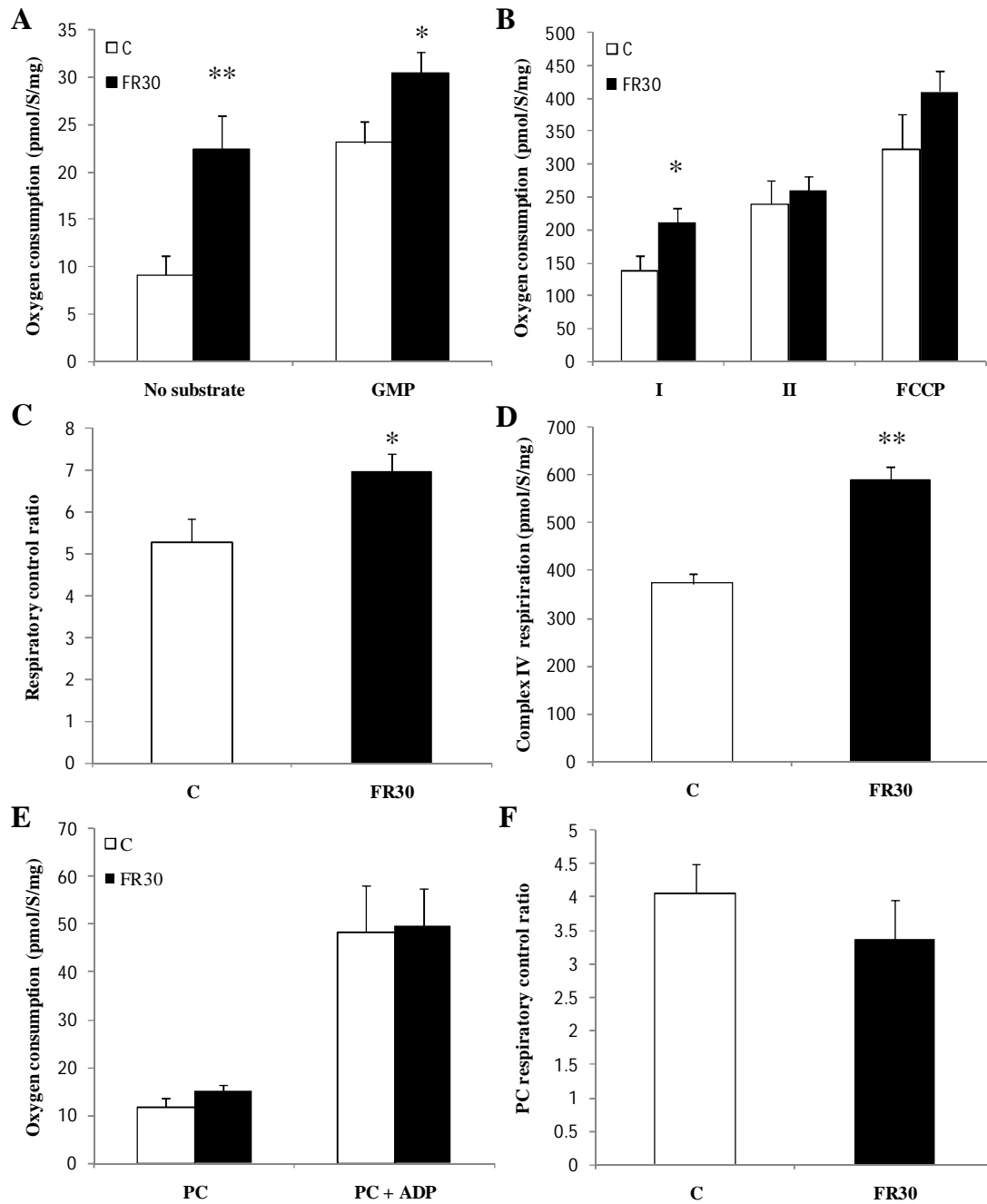


FIG. 4. High-resolution respirometry on enriched placental mitochondrial fraction. Measurement of placental mitochondrial respiration **A:** without substrate or with substrate for complex I (glutamate malate pyruvate: GMP). **B:** in presence of ADP with substrate for complex I and/or complexe II (succinate) and measurement of maximal mitochondrial respiration with an chemical uncoupling molecule (Carbonylcyanide-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone: FCCP). **C:** Respiratory control ratio with GMP consumption. **D:** Complex IV respiration in presence of an inhibitor of complex III (Antimycine A) and a electrons donor (TMPD-Ascorbate). **E:** Measure of mitochondrial oxygen consumption in presence of palmitoyl-carnitine (PC) with or without ADP. **F:** Respiratory control ratio with PC consumption. Control (n=5-8 pools) and FR30 (n=5-6 pools). *, $P < 0.05$ vs FR30 group. **, $P < 0.01$ vs FR30 group.

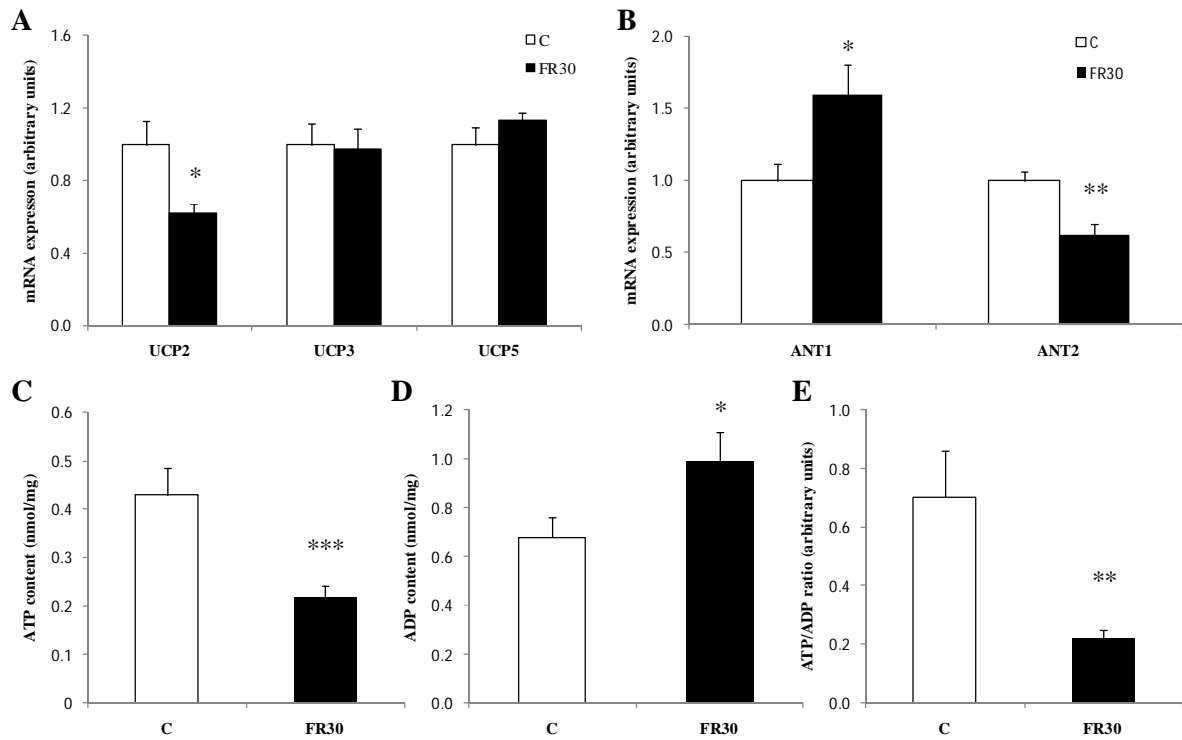


FIG. 5. Measurement of energy production. **A:** Relative quantification by RT-qPCR analyses of UCP genes family. Control (n=7-8); FR30 (n=7-9). **B:** Relative quantification by RT-qPCR analyses of ANT genes family. Control (n= 8-9); FR30 (n=7). **C:** Measurement of placental ATP content. **D:** Quantification of ADP level. **E:** Measurement of ATP/ADP ratio. For C,D,E: n=9 for both control and FR30 groups. *, $P < 0.05$ vs FR30 group. **, $P < 0.01$ vs FR30 group. ***, $P < 0.001$ vs FR30 group.

II. Discussion

Dans cette partie, je vais reprendre les points importants de l'article et je porterai également une attention plus particulière sur les points qui n'ont pu encore être discutés.

a) *Impact de la dénutrition maternelle sur le protéome placentaire du rat FR30 à terme*

Bien que notre étude ne permette de révéler qu'une partie du protéome placentaire, nous pouvons constater que le nombre de protéines modulées par le régime FR30 et mis en évidence par notre analyse, est peu important au vu de la sévérité de la restriction calorique maternelle. En effet, nous avons identifié une dizaine de protéines affectées par ce régime dont 3 seulement ont des facteurs de variations supérieurs à 2. Cependant, la classification de ces protéines, en fonction de leur localisation subcellulaire, a permis de mettre en évidence que 4 d'entre elles ont une localisation exclusivement ou en partie mitochondriale, ce qui suggère que cet organite est particulièrement affecté par la dénutrition maternelle. Avant de discuter ce point, je vais commenter les autres protéines qui ont été identifiées dans notre étude et qui n'ont pu être étudiées ultérieurement.

Pour cela, je vais me baser, dans un premier temps, sur l'étude de Petrak et ses collaborateurs. Ces auteurs ont recensé parmi les études d'électrophorèse bidimensionnelle publiées entre 2004 et 2006 dans le journal *Proteomics*, les protéines dont les identifications sont les plus redondantes (Petrak *et al.*, 2008). Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés uniquement aux travaux provenant d'homogénéisats cellulaires de toutes origines sans inclure les analyses de fluides corporelles, de surnageants de culture cellulaire ou encore de sous-fractionnements tissulaires afin d'identifier les protéines dont l'expression est facilement modulée quelque soit la condition ou la pathologie étudiée et dont l'importance peut parfois être surinterprétée. Dans notre étude, nous avons identifié des modulations de l'expression des peroxyredoxine-1 et -6 qui sont des enzymes antioxydantes. Ces enzymes sont toutes deux largement retrouvées dans les études de protéomique chez les rongeurs et l'Homme. La famille des peroxyredoxines tient même le 1^{er} rang des protéines les plus retrouvées avec une redondance d'identification dans 38 % des études (Petrak *et al.*, 2008). Deux protéines membres de la famille des actines et des malate déshydrogénases ont aussi été retrouvées dans notre étude et sont également identifiées dans respectivement 23 % et 18 % des études protéomiques. La redondance de ces protéines dans d'autres études protéomiques permet dans

un premier temps de les exclure comme marqueurs potentiels d'altérations de la croissance fœtale. Cependant, leur importance n'est pas à amoindrir puisque qu'il a, par exemple, été montré au niveau du placenta, une diminution des défenses antioxydantes associée à un stress oxydatif important dans des cas de RCIU, de pré-éclampsie et de diabète (Wang et Walsh, 2001 ; Myatt, 2010). En effet, le placenta peut produire une multitude d'espèces réactives oxygénées (ROS) comme les ions superoxydes (O_2^-), les radicaux hydroxyl (HO^\cdot) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ceux-ci peuvent entraîner des dommages de l'ADN, une peroxydation des lipides et une oxydation des protéines (Gregersen et Bross, 2010). On peut également observer une production d'espèces réactives azotées *via* la production d'oxyde nitrique (NO) et d'ions peroxynitrite ($ONOO^-$; formé à partir du NO et des ions superoxyde), capables de participer à la nitrosylation des résidus cystéines et à la nitration des résidus tyrosines des protéines, dont les conséquences sur la fonction et la dégradation des protéines sont importantes (Souza *et al.*, 2000 ; Radi, 2004 ; Webster *et al.*, 2006). En effet, des expériences ont montré que le traitement des placentas *in vitro* par des ions peroxynitrites induit une augmentation des résidus nitrotyrosines et atténue la réactivité vasculaire de ces placentas (Kossenjans *et al.*, 2000).

Notre étude a également permis de mettre en évidence des altérations au niveau des protéines α -crystallin β chain (Cryab) et *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A* [encore appelée cyclophiline A (Ppia)]. Cryab est une protéine cytosolique qui participe fortement à la transparence et à la réfraction du cristallin et elle est également un membre des "*small heat shock protein family*" (Andley, 2009). Ainsi, Cryab est une protéine chaperon dont la fonction est de contribuer à la maturation d'autres protéines en leur assurant un repliement tridimensionnel correct. À ce jour, il n'existe qu'une étude ayant reporté l'expression de Cryab dans le placenta. Cette étude a montré que Cryab est exprimée dans le placenta humain à terme, notamment au niveau des cellules déciduales (cellules placentaires bordant l'utérus) et des villosités placentaires (Mineva *et al.*, 2008). Ppia est un enzyme cytoplasmique qui va également accélérer la mise en conformation des protéines de par son activité isomérase au niveau de la proline et qui n'a pas encore été décrite dans le placenta. Des modulations au niveau de ces 2 protéines suggèrent qu'il puisse y avoir des altérations dans le repliement de protéines placentaires. Ce phénomène n'a, à ce jour, pas encore été mesuré au niveau du placenta. De plus, il existe aussi un lien entre le stress oxydatif et le repliement protéique. En effet, le stress oxydatif va induire l'oxydation et la nitration des protéines. Ces modifications vont elles-mêmes participer au stress oxydatif, *via* une augmentation de la production de ROS

d'origine mitochondriale, si ces protéines ne sont pas éliminées assez rapidement notamment par le système ubiquitine/protéasome (Gregersen et Bross, 2010). Il est intéressant de noter également que notre étude a montré une légère diminution de l'expression de la protéine *proteasome subunit β type-2* (Psm2). Le protéasome est un complexe multiprotéique constitué d'un cœur catalytique de 20 S encadré par 2 unités régulatrices de 19 S (Figure 12). La protéine Psm2 fait partie des sous-unités qui composent les 2 anneaux centraux du cœur catalytique et qui vont constituer la chambre catalytique du protéasome au sein duquel les protéines mal conformées et ubiquitinylées vont être dégradées (Nandi *et al.*, 1997). Il existe très peu de données concernant l'activité catalytique protéique au niveau du placenta. Une étude récente a montré que l'activité protéasomale est fortement diminuée dans les placentas humains RCIU (Rajakumar *et al.*, 2008). Une autre étude a également mis en évidence une surexpression des protéines issues de la famille des cullines qui sont des protéines qui participent à l'ubiquitylation des protéines en voie de dégradation, ceci dans les placentas RCIU chez l'Homme (Gascoin-Lachambre *et al.*, 2010). L'ensemble de ces résultats semblent donc suggérer un dysfonctionnement au niveau de la mise en conformation des protéines placentaires dans notre modèle, ce qui peut avoir de lourdes répercussions fonctionnelles dans cet organe qui réalise une synthèse protéique très abondante. Au final, ces phénomènes pourraient induire une accumulation de protéines en voie de dégradation par le système ubiquitine/protéasome. Or, l'activité de ce système est dépendante de l'ATP et nous avons démontré une diminution de la production d'ATP placentaire dans notre modèle. Ce fait associé à la diminution de l'expression d'une des sous-unités du cœur catalytique du protéasome, on peut émettre l'hypothèse qu'une réduction du taux de dégradation des protéines mal conformées au niveau du placenta dans le cadre d'un RCIU, entraînerait un stress oxydatif important qui au final contribuerait à la perturbation de la croissance fœtale et placentaire.

Enfin, notre étude a montré une diminution de l'expression de 2 protéines possédant un rôle important dans le transport du fer : la serotransferrine (encore appelée transferrine) et l'haptoglobine. Le placenta étant un organe richement vascularisé, il n'est pas exclu que l'origine de ces 2 protéines soit du moins en partie sanguine dans notre étude. La transferrine est principalement produite par le foie qui la sécrète dans le sang où elle exerce principalement une fonction de transporteur d'ions ferriques (Fe^{3+}) jusqu'aux tissus cibles (Graham *et al.*, 2007). Cependant, cette protéine semble être aussi exprimée dans le placenta

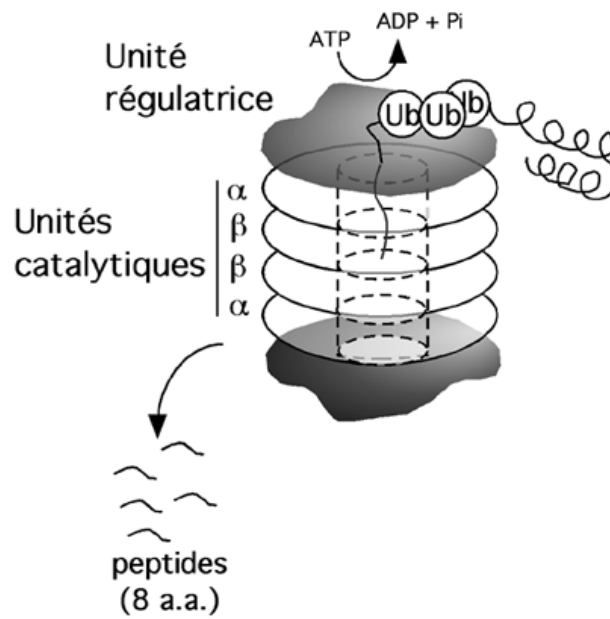


Figure 12 : Représentation schématique de la structure d'un protéasome et de sa fonction. Ub : Ubiquitine. D'après <http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/3d.html>.

puisque son ARN messager ainsi que sa protéine ont été retrouvés dans des cultures de cellules placentaires chez les rongeurs et l'Homme (Morris Buus et Boockfor, 2004). La transferrine a été retrouvée dans la fraction lysosomale des cellules placentaires humaines, ce qui conduit aujourd'hui à considérer que cette protéine jouerait un rôle important dans le transport du fer de la mère au fœtus (Chataway *et al.*, 1998). L'haptoglobine, quant à elle, va jouer un rôle différent dans le transport du fer notamment en cas d'hémolyse. En effet, sa fonction principale est de fixer l'hémoglobine sérique afin d'empêcher la dissociation de l'hème ferrique de la globine et ainsi de prévenir les dommages oxydatifs que peut entraîner le fer (Melamed-Frank *et al.*, 2001). Le complexe hémoglobine-haptoglobine est ensuite éliminé par endocytose au niveau du foie (Kristiansen *et al.*, 2001). Bien que cela n'ait pas été décrit, on ne peut exclure que ce mécanisme puisse comme pour la transferrine participer au transport du fer de la mère au fœtus. L'anémie est la carence micro-nutritionnelle la plus répandue chez la femme enceinte en raison principalement de l'augmentation du volume sanguin maternel et donc du nombre d'hématies maternelles et de l'élévation de l'approvisionnement du fœtus en fer (Scholl, 2005). Chez des femmes anémiées, une diminution du taux circulant de transferrine a été corrélée avec une diminution importante de la concentration sérique en fer (Singhal *et al.*, 1993). Cette carence, est associée en clinique, à une prévalence augmentée d'accouchements prématurés avec de plus, des fœtus présentant un RCIU. Chez le rat, la restriction alimentaire spécifique en fer durant la gestation induit aussi un RCIU chez les fœtus mais, programme également l'apparition d'une hypertension artérielle dès l'âge de 3 mois (Gambling *et al.*, 2002 ; Lewis *et al.*, 2002). En lien avec ces observations, on peut donc envisager que notre régime FR30 induit une diminution importante de la quantité journalière de fer alimentaire absorbée. De plus, la diminution du taux de transferrine placentaire diminuerait également l'approvisionnement du fœtus en cet élément. Au final, ces deux altérations pourraient être impliquées, du moins en partie, dans l'établissement du RCIU mais aussi dans la programmation d'une hypertension artérielle à l'âge adulte. En accord, avec cette hypothèse, cette pathologie a été observée, dans notre laboratoire, chez les animaux FR30 à l'âge adulte (Rivière *et al.*, 2005).

En résumé, l'analyse protéomique des placentas a permis de mettre en évidence 4 grandes voies qui semblent être modulées dans notre modèle. La première implique la balance stress oxydatif/antioxydant. La seconde concerne la mise en conformation des protéines avec les mécanismes de dégradation des protéines mal conformées. La troisième

semble impliquer le transport du fer et enfin la dernière voie concernerait les mitochondries dont les résultats vont être discutés ci-dessous.

b) Impact de la restriction calorique maternelle sur le fonctionnement mitochondrial

Dans notre étude, 18 % des protéines identifiées ont une origine mitochondriale, ce qui en fait le 2nd compartiment subcellulaire le plus affecté par la dénutrition maternelle. À ce jour, très peu d'études se sont intéressées à l'implication des mitochondries dans le fonctionnement placentaire et la croissance fœtale. Cependant, il existe de nombreuses études sur l'impact de la restriction calorique sur le fonctionnement mitochondrial notamment dans le cadre de recherches sur le vieillissement et la longévité.

En effet, dans de nombreuses espèces, une restriction calorique modérée durant une période prolongée est capable d'augmenter significativement l'espérance de vie (Masoro, 2005). Chez le rongeur, une restriction de 30 à 60 %, induite dès le début de la vie, augmente proportionnellement la longévité de 30 à 60 % tandis qu'une autre, débutée à l'âge de 12 mois, ne l'étend que de 10 à 20 % (Weindruch et Walford, 1982). Des expériences ont montré que la dénutrition augmente la durée de vie principalement en prévenant et/ou en retardant l'apparition de pathologies chroniques (Masoro, 2005). Actuellement, le vieillissement est expliqué par de nombreux auteurs par la théorie mitochondriale du vieillissement, qui implique que les ROS produites par la chaîne respiratoire lors de la production d'ATP, vont causer des dommages cellulaires, qui seraient responsables de la sénescence (Harman, 1972). L'action de la restriction calorique sur la longévité semble être corrélée dans différents organes, à une diminution du stress oxydant par une réduction de la production de ROS par les mitochondries mais aussi par une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (Gredilla *et al.*, 2001 ; Sreekumar *et al.*, 2002 ; Bevilacqua *et al.*, 2004). Ces phénomènes pourraient être présents dans nos placentas FR30 issus de mère dénutries puisque nous avons observé une forte augmentation de la peroxiredoxine 1 dans nos placentas issus de mère dénutries. La production de peroxyde d'hydrogène à partir d'un enrichissement mitochondrial semble également être diminuée dans les placentas FR30 (donnée non montrée). Cependant, ces résultats sont préliminaires et donc à interpréter avec précaution. Ceci d'autant plus, que la dénutrition durant la gestation est connue pour provoquer une hausse des taux circulants de

glucocorticoïdes qui sont capables d'induire une diminution des défenses antioxydantes du placenta (Stark *et al.*, 2011).

Dans notre étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressé à l'aspect bioénergétique des mitochondries dans la croissance fœtale. En effet, la mitochondrie va être responsable de la production d'ATP, dont le rôle au niveau du placenta va être capital notamment dans les mécanismes de transport ATP-dépendant de molécules nécessaire à la croissance du fœtus (Bhattacharjee *et al.*, 2010). Dans un premier temps, nous avons constaté que la dénutrition maternelle induit une forte augmentation du nombre de copie d'ADN mitochondrial (ADNmt). Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il a été montré récemment que le poids du fœtus est inversement corrélé à la quantité d'ADNmt dans le placenta humain, ce qui suggère un rôle important des mitochondries dans la croissance fœtale (Lattuada *et al.*, 2008). La restriction calorique montre des résultats similaires au niveau de l'ADNmt associés à une forte biogenèse mitochondriale dans le muscle chez l'Homme (López-Lluch *et al.*, 2006 ; Civitarese *et al.*, 2007). C'est pourquoi, nous avons étudié l'expression de 3 facteurs impliqués à la fois dans la réplication de l'ADNmt et dans la biogenèse des mitochondries : le *nuclear respiratory factor 1* (NRF-1), le *transcription factor A mitochondrial* (TFAM) et le *peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α* (PGC-1 α) (Hock et Kralli, 2009). Nous avons observé une augmentation de l'expression génique de ces 3 facteurs, ce qui suggère une biogenèse mitochondriale accrue dans les placentas FR30. L'ADNmt codant principalement des protéines impliquées dans la chaîne respiratoire et dans l'ATP synthase, nous avons émis l'hypothèse que des modulations de la quantité d'ADNmt et probablement de la biogenèse mitochondriale pourraient avoir des conséquences bioénergétiques sur la production d'ATP globale et sur son efficacité de synthèse. C'est pourquoi, nous avons mesuré par qRT-PCR et western blot, l'expression de différentes protéines impliquées dans la chaîne respiratoire et la synthèse de l'ATP. Nous avons pu mettre en évidence que la dénutrition maternelle induit des modulations d'expression uniquement au niveau des protéines codées par l'ADNmt. Ce résultat peut en partie être expliqué par les modulations d'expression des facteurs NRF-1, TFAM et PGC-1 α , qui interviennent fortement dans la transcription des gènes mitochondriaux (Hock et Kralli, 2009).

L'ensemble de ces résultats suggère que les mitochondries placentaires des animaux FR30 pourraient présenter des perturbations fonctionnelles au niveau de l'activité de leur

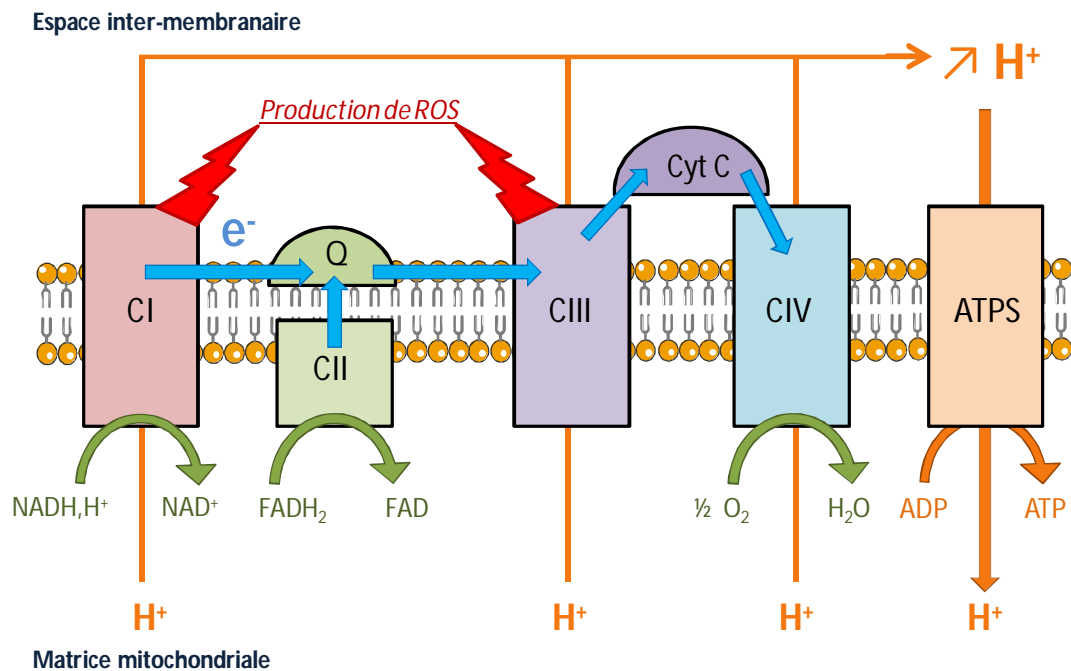


Figure 13 : Représentation schématique de la production d'ATP et de ROS par les mitochondries. La chaîne respiratoire est constituée d'un ensemble de complexes multi-protéiques situés dans la membrane interne des mitochondries, dont le but est de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Pour cela, on observe une réoxydation des cofacteurs réduits, NADH,H^+ et FADH_2 , issus du métabolisme. Ces molécules réduites vont céder 2 électrons à un système de transporteur : le complexe I pour le NADH,H^+ et le complexe II pour le FADH_2 . Ces électrons seront amenés par une cascade d'oxydo-réduction jusqu'à l'accepteur final qui est l'oxygène. Cette cascade va ainsi produire de l'énergie qui sera utilisée pour créer un gradient électrochimique de proton dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie et qui servira pour la synthèse de l'ATP *via* l'ATP synthase (ATPS). Les complexes I et III peuvent également être à l'origine de la production de ROS. Les complexes (C) sont annotés de C-I à C-IV. Q : coenzyme Q ; Cyt : cytochrome C ; NADH,H^+ : nicotinamide adénine dinucléotide forme réduite ; NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide forme oxydée ; FADH_2 : flavine adénine dinucléotide forme réduite ; FAD : flavine adénine dinucléotide forme oxydée ; H^+ : proton ; e^- : électron.

chaîne respiratoire et *in fine* de la synthèse de l'ATP. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des mesures mitochondriales par respirométrie à haute résolution. Cette technique permet de mesurer la consommation d'oxygène au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, en présence de différents substrats et/ou d'inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire (Figure 13). La consommation d'oxygène observée va ainsi refléter l'activité de ces complexes. Par cette technique, nous avons pu observer que la consommation en oxygène des mitochondries FR30 est plus importante lorsque le gradient électrochimique de proton est généré en présence de substrat du complexe I, mais elle reste cependant inchangé en présence de substrat du complexe II. Ce résultat suggère qu'en présence d'une même quantité de substrat, l'efficacité du complexe I à enrichir l'espace intermembranaire mitochondrial en protons (force protomotrice) est plus grande, ce qui devrait permettre, au final, une plus grande capacité de synthèse d'ATP *via* l'ATP synthase. Ce résultat a été confirmé par la mesure du ratio du contrôle respiratoire [ou *respiratory control ratio* (RCR)], qui est obtenu en divisant la consommation d'oxygène durant le stade 3 (c'est à dire en présence de substrats du complexe I et d'ADP, permettant ainsi le couplage de la phosphorylation oxydative) par la consommation d'oxygène au stade 2 (en présence de substrat du complexe I uniquement). Le RCR est ainsi le reflet du couplage de la phosphorylation oxydative et donc de l'efficacité de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase.

L'efficacité de l'ATP synthase varie soit par la modification de la force protomotrice (découplage extrinsèque) soit par la modulation de l'efficacité de pompage des protons par l'ATP synthase elle-même (découplage intrinsèque). Dans la suite de notre étude, nous nous sommes tout particulièrement intéressés au découplage extrinsèque. Ce découplage correspond à une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons qui diminue le gradient électrochimique généré par la chaîne respiratoire. La "fuite" de protons, à l'origine de ce découplage, peut être de 2 types : basale ou inductible. On parle de fuite basale lorsqu'une partie des protons pompés par la chaîne respiratoire retourne dans la matrice mitochondriale par simple diffusion au travers de la membrane interne et ne sert donc pas pour la phosphorylation de l'ADP. Cette fuite est importante puisqu'elle serait responsable de 33 % de la respiration basale mitochondriale dans les hépatocytes et représenterait environ 20 % du métabolisme de base chez le rat (Brand *et al.*, 1994 ; Rolfe et Brown, 1997). La fuite inductible est quant à elle produite par des transporteurs protéiques de protons comme les membres de la famille des protéines découplantes [ou *uncoupling proteins* (UCP)]. À ce jour,

seul l'expression d'UCP2 avait été décrite dans le placenta notamment chez le mouton (Gnanalingham *et al.*, 2007). Dans les placentas FR30, nous avons retrouvé, par qRT-PCR, les transcrits de différents membres des UCP et notamment les ARNm des protéines UCP2, UCP3 et UCP5. Ces résultats sont intéressants car l'expression d'UCP3 avait été jusque là décrite majoritairement au niveau du muscle squelettique et plus minoritairement dans le cœur et le tissu adipeux brun (Boss *et al.*, 1997). De même, l'expression d'UCP5 avait été principalement rapportée dans le système nerveux central (Sanchis *et al.*, 1998). La fonction de ces UCP n'est pas clairement comprise. Cependant il a été montré que des souris dont le gène codant soit pour UCP2 soit pour UCP3 a été inactivé, présentent une production de ROS plus conséquente, ce qui suggère un rôle de ces protéines dans le contrôle du stress oxydatif (Arsenijevic *et al.*, 2000 ; Vidal-Puig *et al.*, 2000). Dans notre étude, nous avons pu constater qu'UCP2 est la forme la plus exprimée dans le placenta et que seule son expression est modulée dans le groupe FR30. Cette observation pourrait impliquer des effets liés à la dénutrition mais aussi l'exposition du placenta aux hormones glucocorticoïdes. En effet, une restriction calorique modérée augmente l'expression placentaire d'UCP2 chez le mouton (Yiallourides *et al.*, 2009) tandis qu'un traitement à la dexaméthasone au contraire l'inhibe (Jones *et al.*, 2010b). Il est également possible que la diminution d'expression d'UCP2 que nous observons dans notre modèle soit, comme il a été montré au niveau du tissu adipeux brun du fœtus, due à la diminution de la leptinémie de nos rates dénutries qui représente un autre facteur capable de moduler ces protéines (Gnanalingham *et al.*, 2005). Au final, cette diminution d'UCP2 devrait réduire en partie la fuite de proton au sein des mitochondries dans les placentas FR30, ce qui pourrait impliquer une augmentation du RCR et donc de l'efficacité de production d'ATP par les mitochondries placentaires en cas de dénutrition.

Nous nous sommes également intéressés au transport cellulaire de l'ATP dans les placentas FR30. Celui-ci implique notamment les membres de la famille des *adenine nucleotide translocase* (ANT). Ces protéines permettent l'échange des nucléotides adényliques (ATP et ADP) entre la matrice mitochondriale et le cytosol cellulaire. Chez les rongeurs, il existe 2 principales formes d'ANT, dénommés ANT1 et ANT2. L'ANT1 est exprimée ubiquitairement où elle favorise le transfert de l'ATP nouvellement synthétisé par l'ATP synthase, vers le cytosol (Stepien *et al.*, 1992). L'ANT2 est, quant à elle, beaucoup moins retrouvée et semble exprimée plus particulièrement dans les cellules en prolifération et dans les tissus à activité glycolytique marquée comme le foie. Le rôle de cette isoforme serait inverse à celui de l'ANT1 puisqu'elle assurerait le transport de l'ATP produit lors de la

glycolyse vers la matrice mitochondriale (Giraud *et al.*, 1998). Il est donc particulièrement intéressant de constater dans notre modèle, une augmentation de l'expression d'ANT1 associée à une diminution d'ANT2 permettant donc de favoriser la disponibilité cytosolique de l'ATP nouvellement formé, que ce soit *via* la mitochondrie ou *via* la glycolyse, dans le but de favoriser le maintien des fonctions cellulaires placentaires. Ce phénomène de plasticité fonctionnelle impliquant la mitochondrie en situation de sous-nutrition n'a, à notre connaissance, jamais été démontré dans le placenta.

L'ensemble de nos données suggèrent qu'en cas de dénutrition et/ou RCIU, les placentas vont adapter leur métabolisme énergétique dans le but d'optimiser la production d'ATP placentaire. Cependant, le dosage des taux d'ATP et d'ADP globaux dans les placentas FR30, a mis en évidence qu'en dépit de ces changements moléculaires et fonctionnels, cette réorganisation bioénergétique n'est pas suffisante pour maintenir une quantité optimale d'ATP placentaire. La réduction des taux d'ATP formés pourrait en partie s'expliquer par la sévérité du régime alimentaire des animaux du groupe FR30. Au final, de par la réduction du taux de nutriments circulants dans le compartiment maternel mais aussi de par la probable réduction des capacités de transport ATP-dépendants transplacentaire, le régime FR30 induit une profonde restriction de la croissance fœto-placentaire. Nos données démontrent pour la première fois que les mitochondries placentaires pourraient être impliquées directement dans des pathologies associées à des perturbations de la croissance fœtale.

Partie 2 : Recherche par une approche ciblée de facteurs impliqués dans la croissance foetale

Objectifs

En parallèle de l'étude protéomique des placentas issus de rates dénutries (groupe FR30), nous avons réalisé une étude plus ciblée sur certains facteurs considérés comme plus atypiques et qui pourraient également participer au développement fœto-placentaire. Cette seconde partie va ainsi se subdiviser en deux chapitres différents puisque ces études ont utilisé des modèles de restriction calorique différents. Ces chapitres comprennent également une partie clinique avec l'évaluation de ces facteurs dans différents échantillons de placentas et plus particulièrement de fragments de villosités placentaires humaines provenant de grossesses normales et pathologiques.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'expression d'une neurotrophine : le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) dans un organe totalement dépourvu de terminaisons nerveuses qu'est le placenta, ainsi qu'à son éventuelle implication dans le contrôle de la croissance fœto-placentaire.

Ensuite, le dernier chapitre de cette thèse comprendra une étude plus globale d'un peptide : l'apéline, dont la recherche sur sa fonction sur le système cardio-vasculaire et sur le métabolisme est en plein essor mais qui reste encore largement inexplorée concernant sa probable implication sur le développement fœto-placentaire.

Article 2

(Mayeur *et al.*, 2010)

Partie 2.1 : Placental BDNF/TrkB Signaling System is
Modulated by Fetal Growth disturbances in Rat and Human

*Mayeur S., Silhol M., Moitrot E., Barbaux S., Breton C., Gabory A., Vaiman D.,
Dutriez-Casteloot I., Fajardy I., Vambergue A., Tapia-Arancibia L., Bastide B.,
Storme L., Junien C., Vieau D., Lesage J.*

Placenta 31:785-791, 2010.

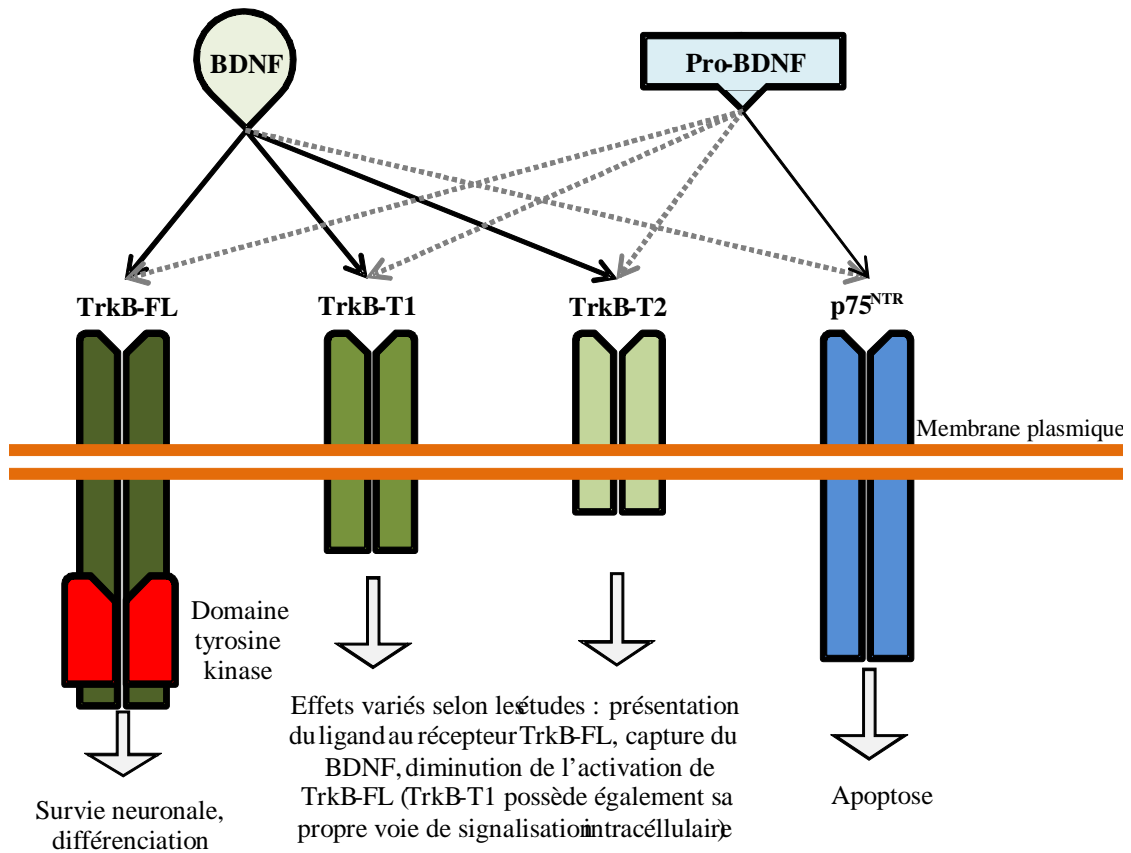


Figure 14 : Représentation schématique des interactions du pro-BDNF/BDNF avec ses récepteurs chez le rongeur. Les liaisons ligand-récepteurs de fortes affinités sont représentées avec des flèches pleines, tandis que celles de plus faibles affinités sont symbolisées par des flèches pointillées. Bien qu'il existe des hétérodimérisations entre les différents récepteurs, celles-ci ne sont pas représentées pour des raisons de clarté.

I. BDNF et ses récepteurs

a) Description et biosynthèse

Le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) est un membre de la famille des neurotrophines, c'est à dire, une famille de polypeptides responsables majoritairement de la croissance et de la survie des neurones lors du développement mais aussi du contrôle des activités des neurones matures à l'âge adulte. Cette neurotrophine fut isolée pour la 1^{ère} fois à partir de cerveau de porc (Barde *et al.*, 1982) et son gène fut ensuite cloné en 1990 (Jones et Reichardt, 1990). Chez l'Homme, ce gène code une préproprotéine de 247 acides aminés (AA). Après, avoir été transcrit au niveau du réticulum endoplasmique, la préproprotéine est ensuite sécrétée suivant la voie constitutive ou selon la voie régulée de sécrétion (Mowla *et al.*, 1999). Une fois dans le milieu extracellulaire, le pro-BDNF est ensuite clivé en une forme mature de 119 AA par une sérine protéase de type plasmine ou par des métalloprotéinases matricielles comme MMP7 et MMP3 (Lee *et al.*, 2001). Une autre étude a également montré que la maturation du pro-BDNF peut s'effectuer lors de la voie intracellulaire de sécrétion *via* des enzymes de type furine (Mowla *et al.*, 2001a). L'action du BDNF mature s'effectue ensuite *via* 2 types de récepteurs : les récepteurs "*Tropomyosin related kinase*" de type B (TrkB) et le récepteur *p75 neurotrophin receptor* (p75^{NTR}).

Le BDNF ayant une plus forte affinité pour les récepteurs TrkB, la majeure partie de son action biologique s'effectue *via* celui-ci. La fixation du BDNF mature sur le TrkB va provoquer sa dimérisation puis la phosphorylation et l'activation des domaines tyrosines kinases cytosoliques, ce qui initie une cascade de signalisation intracellulaire. Il existe différentes isoformes de TrkB qui sont issues de l'épissage alternatif de son ARN messager. Ceci génère trois sous-types de récepteurs de longueur différente : le récepteur de grande taille et de pleine activité (TrkB-FL) et deux formes tronquées de plus petite taille (TrkB-T1 et TrkB-T2). Bien que ces dernières soient tronquées au niveau de la partie catalytique intracellulaire, ces formes sont également biologiquement actives (Figure 14) (Baxter *et al.*, 1997). En effet, l'activation du récepteur TrkB-T1 a été décrite pour induire une activation de la voie de signalisation de type calcium dépendante associée à l'inositol-1, 4, 5-triphosphate sans pour autant que son rôle exact n'ait été décrit (Rose *et al.*, 2003). Longtemps, le pro-BDNF a été considéré comme inactif. Des données plus récentes ont montré que le

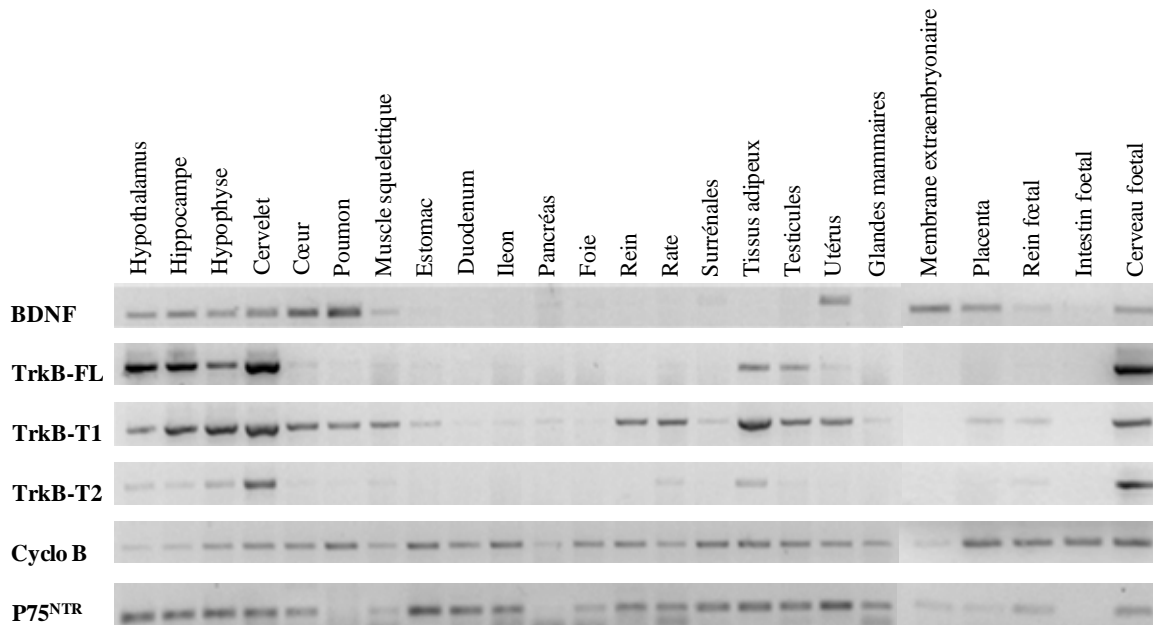


Figure 15 : Distribution tissulaire du BDNF et de ses récepteurs chez le rat. Cette distribution a été effectuée par RT-PCR dans le laboratoire sur des tissus adultes ou provenant de l'unité foeto-placentaire au 21^{ème} jour embryonnaire (E21). La cyclophiline B a été utilisée comme témoin interne.

pro-BDNF est capable de promouvoir également l'autophosphorylation du récepteur TrkB (Mowla *et al.*, 2001b). Cependant, le pro-BDNF se fixe et active avec une plus grande affinité le récepteur p75^{NTR} (Lee *et al.*, 2001). Un niveau de complexité supplémentaire a été récemment suggéré par la mise en évidence d'une hétérodimérisation entre le récepteur p75^{NTR} et le récepteur TrkB (Michaelsen *et al.*, 2010).

b) Distribution tissulaire

Dans chaque espèce, l'expression de l'ARNm du BDNF se situe principalement au niveau du système nerveux central et de la moelle épinière (Figure 15). Cependant, son expression n'est pas strictement restreinte aux tissus nerveux. Comme le montre la figure 15, le muscle squelettique, les systèmes cardio-respiratoires ou encore de nombreux éléments de l'unité fœto-placentaire expriment également cette neurotrophine. Chez l'Homme, une grande quantité de BDNF a été également retrouvée au niveau de la rate (Yamamoto *et al.*, 1996).

Chez le rat, les récepteurs TrkB-FL et TrkB-T2 ont une distribution d'expression tissulaire similaire à celle du BDNF. Leurs ARNm sont largement retrouvés au niveau du système nerveux central et plus minoritairement dans les organes périphériques comme le tissu adipeux ou encore les testicules (Figure 15). L'isoforme TrkB-T1 est quant à elle plus largement exprimée dans les tissus chez le rat et l'Homme mais sa distribution cellulaire est plus complexe (Yamamoto *et al.*, 1996). En effet, bien que la forme longue de TrkB soit majoritairement retrouvée dans les neurones, la forme tronquée TrkB-T1 semble présente uniquement dans les cellules non neuronales et plus particulièrement dans les cellules gliales qui expriment le récepteur TrkB-FL (Armanini *et al.*, 1995). En ce qui concerne le récepteur p75^{NTR}, celui-ci semble être exprimé dans la plupart des organes mais à des taux plus faibles (Figure 15). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que le BDNF possède des fonctions physiologiques bien plus larges que la seule fonction neuronale décrite pour cette neurotrophine.

c) Régulation de l'activité du BDNF

Le BDNF possédant des fonctions très diverses, une régulation fine de son action biologique est donc nécessaire. Le premier type de régulation est d'abord, lié à la structure du

gène du BDNF. Une récente étude a disséqué ce gène chez l'Homme et a montré une structure très complexe avec 11 exons dont un seul code pour la protéine complète (Pruunsild *et al.*, 2007). Les 10 autres exons, situés dans la région 5' non codante, sont chacun sous le contrôle de promoteurs et qui génèrent différents épissages alternatifs codant pour la même protéine. Chaque promoteur répondant à des stimuli différents, cette structure génique complexe aboutit à une régulation fine de l'expression du BDNF suivant l'organe ou le type cellulaire concerné. En effet, Pruunsild et ses collaborateurs ont montré que chacun des transcrits ainsi générés possède sa propre distribution tissulaire (Pruunsild *et al.*, 2007). Un second type de régulation se fait par l'intermédiaire de l'expression d'un ARN antisens qui inhiberait l'expression des ARN messagers. Cependant, ce système de régulation semble spécifique à l'Homme puisqu'il n'a pas été retrouvé ni chez les rongeurs (Aid *et al.*, 2007), ni chez d'autres primates (Liu *et al.*, 2005). Enfin, l'expression du BDNF semble également soumise à des régulations épigénétiques puisque sa synthèse dans les neurones chez la souris est corrélée avec une diminution de la méthylation de son gène (Martinowich *et al.*, 2003).

Les récepteurs du BDNF vont également jouer un rôle fondamental dans la régulation de son activité. Ainsi, il a été suggéré que les formes tronquées du récepteur TrkB pourraient agir comme des pièges moléculaires qui réguleraient la disponibilité locale en neurotrophine (Biffo *et al.*, 1995) ou qu'elles pourraient diminuer l'activité du récepteur TrkB-FL par hétérodimérisation (Figure 14) (Haapasalo *et al.*, 2001).

Enfin, l'un des derniers mécanismes de régulation du BDNF réside dans le fait qu'il existe 2 formes de BDNF extracellulaire : le pro-BDNF et le BDNF mature. La forme mature se fixe préférentiellement aux récepteurs TrkB, tandis que le pro-BDNF possède une plus forte affinité pour le récepteur p75^{NTR} (Lee *et al.*, 2001). La distinction entre ces isoformes est importante puisque le TrkB va essentiellement promouvoir la survie neuronale *via* la voie des MAP-kinases (Kaplan et Miller, 2000), tandis que l'activation de p75^{NTR} résulte en l'activation des voies de signalisation pro-apoptotique (Teng *et al.*, 2005). Le concept nommé "modèle *yin et yang* des neurotrophines" résume ainsi la capacité du BDNF et plus généralement des neurotrophines à produire un effet diamétralement opposé sur la survie et la mort cellulaire au sein d'une même cellule (Lu *et al.*, 2005). De ce fait, la régulation de l'expression des différents récepteurs au sein des cellules, ainsi que les mécanismes de maturation protéolytique du BDNF vont jouer un rôle prépondérant. Il a, par exemple, été démontré que le récepteur p75^{NTR} peut être dynamiquement régulé par des

lésions dans le système nerveux et peut induire l'apoptose des cellules endommagées (Beattie *et al.*, 2002).

d) Fonction Physiologique du BDNF

i. Au niveau du système nerveux central

Le BDNF a un rôle important, et ce, très tôt durant le développement d'un individu puisqu'il joue un rôle important dans la plupart des processus intervenant dans le développement et la maturation du système nerveux central, notamment dans la prolifération et la migration neuronale, la guidance axonale, la formation des synapses ainsi que la production de neurotransmetteurs et de neuropeptides (Tapia-Arancibia *et al.*, 2004). Ainsi, un taux maximal de BDNF a été montré au niveau de l'hypothalamus chez le rat lors du 7^{ème} jour postnatal, période correspondant à une forte organisation neuronale aboutissant par exemple au développement des connexions impliquées dans la régulation de la prise alimentaire (Silhol *et al.*, 2005).

Bien qu'initialement connue pour son action sur le développement néonatal, de grandes concentrations de cette neurotrophine persistent dans le cerveau du rat adulte, ce qui suggère que le BDNF possède un rôle important tout au long de la vie (Silhol *et al.*, 2005). Le BDNF semble être impliqué dans la neurogenèse de nouvelles cellules, qui pourrait remplacer celles perdues après une lésion cérébrale (Pencea *et al.*, 2001). De plus, le BDNF semble également jouer un rôle important au niveau de l'hippocampe dans les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation à long terme (Lynch *et al.*, 2008).

ii. Fonctions périphériques et actions non-neurotrophiques du BDNF

L'expression du BDNF et/ou de ses récepteurs dans des tissus non-neuronaux (Figure 15), suggère que cette neurotrophine peut avoir d'autres fonctions physiologiques. Il a par exemple été suggéré que le BDNF interviendrait dans la régulation de la prolifération des cellules germinales testiculaires (Robinson *et al.*, 2003). Il y a également d'autres données qui montrent que le BDNF joue aussi un rôle dans la fonction intestinale. Par exemple, le BDNF intervient, au niveau du colon chez le rat, dans la genèse du mouvement péristaltique, *via* des

modulations de l'activité neuronale et de la communication synaptique entérique (Boesmans *et al.*, 2008).

Le BDNF intervient également dans le métabolisme. Il a été démontré que cette neurotrophine normalise les taux plasmatiques de glucose chez les souris déficientes en récepteurs B de la leptine (Nakagawa *et al.*, 2000). Cet effet semble être lié à une augmentation de l'utilisation du glucose dans le muscle et dans le tissu adipeux brun (Yamanaka *et al.*, 2007b). De plus, il a également été montré que l'effet antidiabétique du BDNF serait lié à son action sur l'expression des hormones pancréatiques. Ainsi, l'injection sous-cutanée de BDNF augmente les taux pancréatiques d'insuline (Yamanaka *et al.*, 2007a) et diminue ceux du glucagon (Hanyu *et al.*, 2003), ce qui stimule au final la captation du glucose par les organes périphériques.

De nombreuses données suggèrent également que le BDNF intervient dans la régulation de la prise alimentaire. Il a été décrit que l'injection centrale de BDNF dans le ventricule latéral chez le rat induit une perte de poids ainsi qu'une diminution de l'appétit de façon dose dépendante (Pellemounter *et al.*, 1995). De plus, ces auteurs ont rapporté que la perfusion directe de BDNF dans l'hypothalamus diminue la prise alimentaire, ce qui indique que cette neurotrophine pourrait interagir avec les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de ce comportement. D'autres études ont également montré que l'injection sous-cutanée de BDNF diminue l'appétit chez la souris (Hanyu *et al.*, 2003). En lien avec ces dernières données, des souris déficientes hétérozygotes en BDNF présentent une hyperphagie qui s'accompagne chez le jeune adulte d'une prise de poids importante (Lyons *et al.*, 1999). Plus récemment, d'autres auteurs ont montré que la délétion du gène du BDNF, spécifiquement dans les noyaux ventro-médian et dorso-médian hypothalamiques, résulte en une hyperphagie conduisant à une obésité chez des souris adultes (Unger *et al.*, 2007). L'effet du BDNF sur la prise alimentaire a été confirmé chez l'Homme puisqu'une corrélation positive a été montrée entre le taux circulant de BDNF et l'IMC (Monteleone *et al.*, 2004). Ces auteurs ont également rapporté que le taux plasmatique de BDNF est fortement réduit chez les femmes souffrant d'anorexie mentale, tandis qu'ils sont augmentés chez les femmes obèses.

Plus récemment, il a été démontré que le BDNF ainsi que les autres neurotrophines sont capables d'exercer une fonction angiogénique marquée, ce qui leur a valu la dénomination "d'angioneurine" (Zacchigna *et al.*, 2008). Ainsi, le BDNF, par fixation au

récepteur TrkB-FL des cellules endothéliales, stimule l'angiogenèse au niveau du cœur, du muscle squelettique et de la peau (Kermani *et al.*, 2005). Des études génétiques, chez la souris, ont également montré que le BDNF est impliqué durant le développement et la maintenance de la stabilité de la paroi des vaisseaux sanguins notamment au niveau cardiaque (Kermani et Hempstead, 2007).

e) Pourquoi étudier le BDNF placentaire dans notre modèle de RCIU ?

Il nous a semblé pertinent d'étudier le BDNF placentaire pour différentes raisons. Dans un premier temps, le BDNF a un rôle important au niveau de l'angiogenèse. Le placenta étant un organe richement vascularisé et contenant à la fois le sang d'origine maternelle et celui d'origine fœtale, il est clair que des dysfonctionnements au niveau de l'angiogenèse au cours du développement du placenta peuvent avoir de lourdes conséquences sur les échanges fœto-placentaires et donc sur la croissance du fœtus. De plus, peu de choses sont connues à propos du BDNF et de ses récepteurs au niveau du placenta et aucune étude, sur ce sujet, n'a encore été faite chez l'Homme. Des données récentes combinant des expérimentations menées à la fois *in vitro* et *in vivo* chez des souris, ont démontré l'importance du BDNF dans le développement placentaire. Ainsi, le traitement de cellules trophoblastiques placentaires par un inhibiteur pharmacologique des récepteurs Trk : le k252a ou encore par l'injection de l'ectodomaine TrkB bloquant le BDNF endogène, entraînent tous deux une diminution de la prolifération des trophoblastes et augmente leur apoptose. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez des souris gestantes et ont clairement démontré que l'inhibition du système BDNF/TrkB diminue l'épaisseur de la zone labyrinthique placentaire, ce qui a pour conséquence de limiter les échanges fœto-placentaires et donc la croissance du fœtus (Kawamura *et al.*, 2009).

Deuxièmement, une étude menée au laboratoire a montré qu'une diminution de la ration alimentaire de 50 % durant la dernière semaine de gestation chez la rate, augmente la quantité de BDNF dans l'hypothalamus des fœtus à E21, et provoque une prolifération cellulaire au niveau des certains noyaux hypothalamique impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Coupé *et al.*, 2009). Le BDNF retrouvé dans cette étude, peut avoir une origine à la fois maternelle, fœtale ou encore placentaire, puisque le BDNF est capable de traverser la barrière fœto-placentaire (Kodomari *et al.*, 2009). Cette dernière étude démontre

également que les taux de BDNF peuvent être modulés en période prénatale par une sous-nutrition maternelle, elle-même fréquemment associée à un risque accru de RCIU pour le fœtus.

Enfin, nous avons observé par qRT-PCR que le niveau d'expressions du BDNF d'origine placentaire et cérébrale chez l'Homme est très proche (données non montrées car l'échantillonnage est faible). Ceci montre que la production du BDNF placentaire est loin d'être négligeable et que cette neurotrophine doit exercer des rôles physiologiques importants à l'interface fœto-maternelle. Des études ont montré que la barrière hémato-encéphalique est immature *in utero* et peut laisser passer, au travers de celle-ci, le BDNF produit dans le cerveau fœtal (Poduslo et Curran, 1996) ou encore celui provenant du sang maternel (Kodomari *et al.*, 2009). De ce fait, il a été proposé que les taux fœtaux de BDNF circulant puissent refléter les taux dans le système nerveux central et donc indirectement servir d'index de maturité cérébrale du fœtus (Chouthai *et al.*, 2003). Cependant, ces études négligent totalement le placenta ainsi que les annexes extra-embryonnaires comme une source potentielle et conséquente de BDNF dans l'unité fœto-placentaire.

f) Objectifs

Dans cette étude, nous nous sommes, dans un premier temps, intéressé à l'étude de l'expression placentaire du système BDNF/TrkB par qRT-PCR chez l'Homme dans le cadre de grossesses présentant des croissances fœtales altérées comme le RCIU ou encore la macrosomie. Puisque l'expression de ce couple est altérée lors d'altérations de la croissance fœtale, nous avons utilisé un modèle de RCIU précédemment utilisé au laboratoire et qui consiste en une réduction de 50 % la ration alimentaire journalière des rates durant la dernière semaine de gestation uniquement.

Article : Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human 1/7

Mayeur S., Silhol M., Moitrot E., Barbaux S., Breton C., Gabory A., Vaiman D., Dutriez-Casteloot I., Fajardy I., Vambergue A., Tapia-Arancibia L., Bastide B., Storme L., Junien C., Vieau D., Lesage J.

Placenta 31:785-791, 2010.

Article 2/7

Article 3/7

Article 4/7

Article 5/7

Article 6/7

Article 7/7

II. Discussion

Notre étude a permis d'apporter de nouveaux arguments renforçant l'importance du BDNF produit par le placenta sur le contrôle de la croissance fœtale. Dans cette discussion, je discuterai plus particulièrement de l'importance de la localisation du couple BDNF/TrkB dans le but de déterminer son hypothétique fonction au niveau du placenta, mais aussi son rôle potentiel dans la croissance fœtale et le concept de programmation de pathologies.

a) La localisation de cette neurotrophine nous permet-elle de déterminer sa fonction ?

La faible quantité d'études sur le BDNF placentaire ne nous permet pas de déterminer clairement sa fonction mais plutôt d'émettre des hypothèses. L'expérience d'hybridation *in situ*, chez le rat, a montré pour la première fois, la localisation du BDNF et des récepteurs TrkB dans le placenta. L'ARNm du BDNF est détecté principalement dans la decidua qui est la zone d'implantation du placenta dans l'utérus. Les récepteurs TrkB sont exprimés au niveau de la decidua et du trophospongium. Cette dernière est une zone importante du placenta car elle est un site de production de nombreuses hormones placentaires telles que les IGF par exemple (Forbes et Westwood, 2008). L'expression du BDNF et de ses récepteurs à ces niveaux pourrait ainsi suggérer une action du BDNF sur l'expression de ces hormones et indirectement participer au contrôle de la croissance fœtale. De plus, la decidua et le trophospongium sont des zones du placenta traversées chez le rongeur par une ou plusieurs artères maternelles centrales et par de nombreuses veines maternelles périphériques (Georgiades *et al.*, 2002). De par son action pro-angiogénique, le couple BDNF/TrkB produit dans cette zone, pourrait également intervenir sur le développement et la croissance des vaisseaux sanguins placentaires maternels comme cela a été montré dans d'autres tissus (Zacchigna *et al.*, 2008). Cette action pouvant se faire au niveau des cellules endothéliales comme il a été précédemment décrit dans le placenta humain à terme (Leach *et al.*, 1994), ou encore sur les cellules trophoblastiques (Kawamura *et al.*, 2009). On peut aussi émettre l'hypothèse que la localisation dans cette zone permette au système BDNF/TrkB d'être impliqué dans le phénomène d'invasion trophoblastique du placenta. Ce processus a lieu en début de grossesse et implique les cellules trophoblastiques placentaires qui vont se comporter

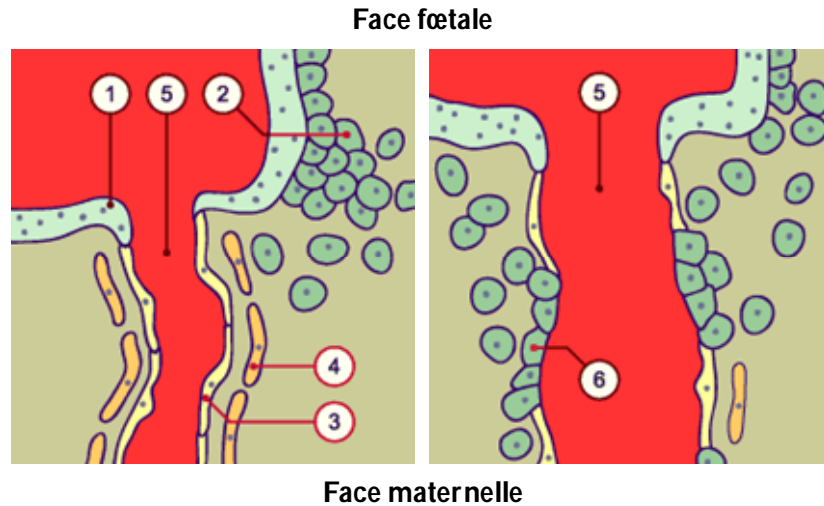


Figure 16 : Représentation schématique de l'invasion trophoblastique durant le 1^{er} trimestre chez la femme enceinte. 1 : syncytiotrophoblastes ; 2 : cytotrophoblastes ; 3 : cellules endothéliales ; 4 : cellules musculaires lisses ; 5 : artère maternelle ; 6 : cytotrophoblaste endovasculaire.

D'après <http://www.embryology.ch/francais/fplacenta/villosite03.html>.

comme des cellules "pseudo-tumorales" et envahir l'endomètre grâce à la sécrétion d'enzymes à activité protéolytique agissant sur la matrice extracellulaire telles que des métalloprotéinases matricielles (Anin *et al.*, 2004). Au cours de ce phénomène, ces cellules vont migrer vers la paroi des vaisseaux maternels, ce qui conduit à la destruction des cellules musculaires lisses par un mécanisme encore peu compris et résulte au final en un remplacement partiel des cellules endothéliales par des cellules trophoblastiques (Figure 16) (Georgiades *et al.*, 2002). Cette transformation de la paroi vasculaire va ainsi donner de l'élasticité à ces vaisseaux provoquant leur élargissement. De plus, ces vaisseaux ne possédant plus de cellules musculaires lisses, ils ne seront plus capables de répondre aux signaux vasomoteurs provenant de la mère (Georgiades *et al.*, 2002). Ce processus physiologique permet l'adaptation de la vascularisation de l'unité fœto-placentaire à la croissance rapide du fœtus en augmentant de manière considérable le flux sanguin entrant dans le placenta. Il a d'ailleurs été montré qu'une défaillance de ces processus est retrouvée dans des placentas associés à un RCIU (Khong *et al.*, 1986). Les mécanismes de régulation de l'invasion trophoblastique restent encore peu connus et semblent être en partie, sous le contrôle de cytokines sécrétées par les cellules *natural killer* utérines (Knöfler *et al.*, 2008). De par l'action sur la prolifération cellulaire du couple BDNF/TrkB sur les trophoblastes (Kawamura *et al.*, 2009), il nous semble donc envisageable que cette neurotrophine puisse participer au contrôle de l'invasion trophoblastique.

b) Le couple BDNF/TrkB contribue-t-il à la croissance fœtale ?

Dans notre étude, nous avons montré que le BDNF et son récepteur TrkB sont modulés au niveau du placenta lors d'altérations de croissance fœtale. Toutefois, ces modulations restent difficiles à interpréter quant à leurs implications précises dans la croissance fœtale au vu du faible nombre d'études traitant de ce sujet, et de par le fait que ces variations sont opposées lorsque l'on passe du rat à l'Homme. Ces différences pourraient s'expliquer par des fonctions différentes du BDNF placentaire entre ces deux espèces. On peut aussi signaler qu'au niveau génétique, les études de polymorphisme, ne montrent pas de clair impact du BDNF sur la croissance fœtale. En effet, Kilpeläinen et ses collaborateurs n'ont pas trouvé de corrélation entre un polymorphisme génique au niveau du BDNF et le poids de naissance (Kilpeläinen *et al.*, 2011), tandis que Morgan et ses collaborateurs ont montré le contraire (Morgan *et al.*, 2010). Cependant, l'analyse de sang de cordon ombilical à la

naissance chez l'Homme a permis de montrer une corrélation inverse entre le taux de BDNF et le poids de naissance (Wang et Ye, 2008). Ce résultat est concordant avec notre étude puisque l'expression génique placentaire est augmentée chez l'Homme lors du RCIU. Afin de définir plus précisément l'impact de cette neurotrophine sur la croissance fœtale, différentes expérimentations animales pourraient être effectuées en utilisant par exemple des pompes osmotiques permettant la diffusion de BDNF ou de son inhibiteur : le k252a, durant la phase où la croissance fœtale est maximale.

Au final, nos résultats suggèrent que le BDNF pourrait être un acteur de la croissance fœto-placentaire. Dans le cadre de ma thèse, ces résultats ont été discutés dans une revue d'hypothèses médicales relative à l'impact de la famille des neurotrophines sur la croissance fœtale (Mayeur *et al.*, 2011). Celle-ci est incluse ci-contre.

Article 3

(Mayeur *et al.*, 2011)

Do neurotrophins regulate the feto-placental development?

Mayeur S., Lukaszewski M.A., Breton C., Storme L., Vieau D., Lesage J.

Med Hypotheses 76:726-728, 2011.

article MH 1/3

article MH 2/3

article MH 3/3

Partie 2.2 : Étude du système apélinergique durant la
gestation chez le rat et l'Homme : focus sur son éventuelle
implication sur la croissance fœtale.

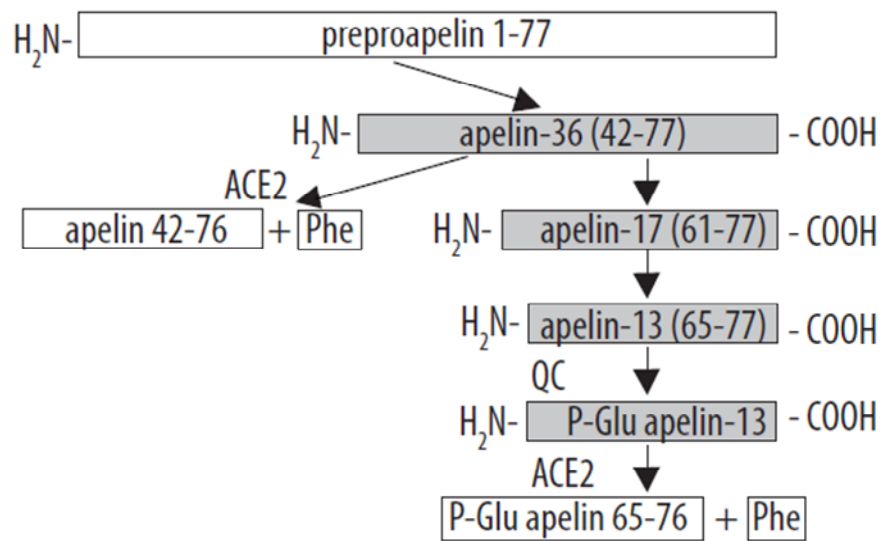


Figure 17 : Synthèse et métabolisme de l'apéline. Les peptides biologiquement actifs sont en gris (les peptides les plus actifs étant les plus courts). QC : glutaminyl cyclase ; ACE2 : angiotensin-converting enzyme-2 ; P-Glu : résidu pyroglutamate ; Phe : phénylalanine. Adaptée de (Bełowski, 2006).

I. Le système apélinergique

a) Description et biosynthèse

C'est grâce à une technique dite de "pêche à la ligne" à partir d'une banque génomique humaine, c'est à dire une méthodologie basée sur l'utilisation d'amorces dégénérées localisées dans des séquences plus ou moins conservées des régions transmembranaire de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, que fut identifié et cloné le gène APJ (O'Dowd *et al.*, 1993). Chez l'Homme, la protéine APJ est formé par 380 AA et montre une forte homologie avec le récepteur de type 1 des angiotensines (AT-1), soit 31 % sur la séquence globale et 54 % pour les séquences transmembranaires. Cependant, en dépit de cette similitude, l'angiotensine 2 n'active pas des cellules exprimant le récepteur APJ (O'Dowd *et al.*, 1993). Aucun ligand n'étant connu, ce récepteur fut considéré comme orphelin jusqu'en 1998. Le ligand endogène fut donc identifié 5 ans après, à partir d'estomac de bœuf, au moyen de techniques chromatographiques couplées à un système de criblage fondé sur la mesure des variations du pH extracellulaire de cellules CHO exprimant le récepteur APJ humain (Tatemoto *et al.*, 1998). Après, séquençage de ce ligand, alors nommé apéline, ces auteurs ont cloné son gène et montré qu'il code pour une préproprotéine de 77 AA contenant un peptide signal de sécrétion et un peptide actif de 36 AA appelé apéline (42-77) ou apéline-36 dont l'alignement de séquences en AA montre une très forte homologie entre les différentes espèces et une conservation stricte des 17 AA C-terminaux (Figure 17). Ces auteurs ont enfin montré que l'apéline-36 est capable d'être maturée afin de générer des peptides C-terminaux de plus en plus courts et actifs : l'apéline (61-77) ou apéline-17 et l'apéline (65-77) ou apéline-13. L'apéline-13 possède, à son extrémité N-terminale, un résidu glutamate qui peut se cycliser en pyroglutamate (pGlu-apéline-13), ce qui rend le peptide moins sensible à la dégradation par les aminopeptidases (Tatemoto *et al.*, 1998).

Les mécanismes de maturation de l'apéline ne sont pas bien connus. Cependant, les clivages s'effectuent en aval de deux doublets basiques d'arginine. Récemment, il a été également montré que les différents peptides de l'apéline peuvent, sous l'action de l'*angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2), perdre leurs résidus phénylalanines C-terminaux (Vickers *et al.*, 2002). Ce clivage semble être un moyen de régulation de l'activité de l'apéline puisqu'il aboutit à l'inactivation de son action sur le récepteur APJ (De Mota *et al.*, 2000).

Tableau 6 : Distribution tissulaire de l'ARNm de l'apéline et APJ chez le rat, la souris et l'Homme. D'après (Kleinz et Davenport, 2005).

	APJ			Apéline		
	Rat	Souris	Humain	Rat	Souris	Humain
Cerveau	++	+	+++	+	+++	++
Cervelet	+		+	+		+
Hypophyse	+		+	+		++
Moelle épinière	+++	++	+	++		++
Surrénales	+			+		
Thyroïde	++					
Rate	-	+	+++	-	+	
Thymus		+	+		-	
Cœur	++	+++	+	++	++	+
Cellules endothéliales	++					
Poumons	+++	++	++	+++	++	+
Estomac	+		+	+		-
Intestin grêle	+		++	+		-
Gros Intestin	+		++	+		
Foie	+	+		-	-	-
Pancréas	-		+	-		+
Reins	+	+	+	+	+	+
Testicules	+	+	+	+	++	+
Prostate			+			+
Ovaires	+	+	+	+	+	
Utérus	+	+	+	+	-	-
Placenta	++		++			+++
Glande Mammaire	+			++		
Muscle squelettique	++	++	+	+	+	-
Tissu adipeux	++			+		
Cartilage	++					

L'intensité d'expression est montrée par le signe +. Le signe - symbolise une absence d'expression et une case vide indique que la présence n'a pas été vérifiée.

b) Distribution tissulaire

L'expression de l'apéline dans des glandes endocrines suggère qu'elle peut agir comme une hormone. Cependant, ses taux circulants sont plutôt faibles [de l'ordre du picomolaire chez l'Homme (Azizi *et al.*, 2008) et de l'ordre du nanomolaire chez le rat (De Mota *et al.*, 2004)]. En conséquent, bien que cette hormone puisse agir à distance *via* la circulation sanguine, il semble probable qu'une part importante de son action physiologique s'exerce de façon paracrine et autocrine. L'ARNm de l'apéline et de son récepteur est retrouvé au niveau du système nerveux central notamment dans le cerveau et le cervelet (Tableau 6). Plus précisément, il a été montré que les neurones des noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus expriment de fortes concentrations d'APJ (Lee *et al.*, 2000). D'autres études ont également montré que l'expression du récepteur APJ est détectée au niveau des neurones, des oligodendrocytes et des astrocytes mais pas dans les macrophages et les cellules de la microglie (Choe *et al.*, 2000).

Au niveau périphérique, le système apélinergique semble globalement être exprimé, à quelques exceptions près, dans la plupart des organes et tissus (Tableau 6). L'ARNm de l'apéline est retrouvé chez le rat dans l'estomac et l'intestin mais aussi dans le cœur, les reins et le tissu adipeux (Wang *et al.*, 2004). Il est également fortement exprimé au niveau de la glande mammaire (Habata *et al.*, 1999) et du poumon (Kawamata *et al.*, 2001). Chez le rat, l'ARNm du récepteur APJ est retrouvé dans les organes richement vascularisés comme le cœur, les poumons ou encore le placenta (Hosoya *et al.*, 2000), mais aussi dans la plupart des tissus périphériques (Tableau 6). Toutefois, l'expression de l'apéline et de son récepteur APJ étant fortement détectée au niveau des cellules endothéliales, une surestimation du niveau d'expression tissulaire des quantités d'apéline et d'APJ peut aussi être le reflet de la densité de la vascularisation de l'organe considéré (Kleinz et Davenport, 2004 ; Masri *et al.*, 2004 ; Kasai *et al.*, 2004).

La distribution tissulaire des différentes formes moléculaires d'apéline est, à ce jour, moins décrite. On retrouve majoritairement la forme pGlu-apéline-13 dans le cerveau et en plus faible quantité l'apéline-17 (De Mota *et al.*, 2004). Dans le testicule et l'utérus, c'est l'apéline-36 qui prédomine, alors que, dans la glande mammaire, on observe à la fois de l'apéline-36 et la pGlu-apéline-13 (Kawamata *et al.*, 2001). Enfin, l'apéline-17 et la pGlu-apéline-13 sont les formes prédominantes d'apéline dans le plasma.

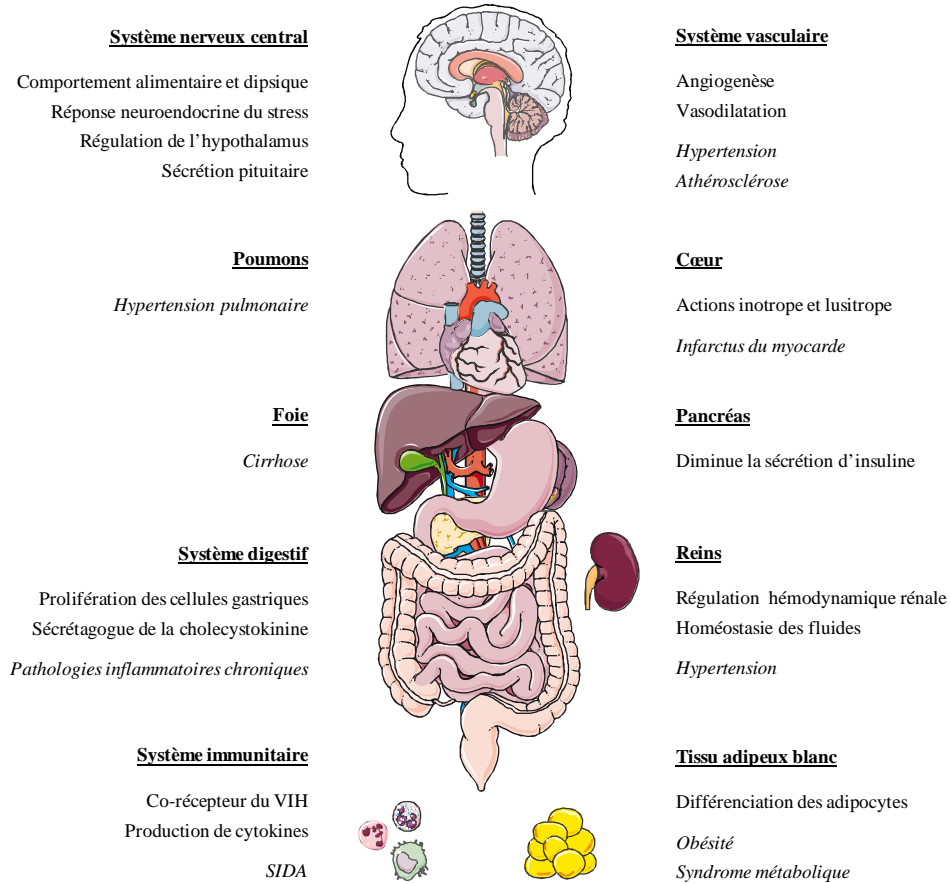


Figure 18 : Vue globale des différentes fonctions du système apélinergique. Les pathologies, auxquelles ce système semble exercer un rôle important et pouvant constituer une cible thérapeutique, sont indiquées en italique. Figure réalisée grâce à Servier Medical Art et adaptée de (Falcão-Pires *et al.*, 2010).

c) Fonction physiologique du système apélinergique

Comme le montre la figure 18, l'apéline possède de nombreuses fonctions tant au niveau central qu'en périphérie. Ainsi, dans cette partie, je me focaliserai sur les principales fonctions de l'apéline.

i. Au niveau du système nerveux central

Le système apélinergique est exprimé dans des structures impliquées dans l'équilibre hydro-minéral et le comportement dipsique, c'est à dire le contrôle de la soif. L'apéline et son récepteur sont ainsi particulièrement abondants dans les noyaux supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus au sein desquels, ils sont co-localisés avec les neurones à vasopressine (De Mota *et al.*, 2004 ; Reaux-Le Goazigo *et al.*, 2004). La vasopressine (AVP) est une puissante hormone antidiurétique agissant au niveau du rein pour permettre une réabsorption d'eau au niveau de l'urine primaire dans les canaux collecteurs; elle induit aussi une vasoconstriction et augmente la pression artérielle. De ce fait, il a été rapidement envisagé un possible rôle du système apélinergique dans l'homéostasie des fluides en régulant par exemple la libération d'AVP au niveau de la neurohypophyse. Cette hypothèse fut confirmée par la suite. En effet, l'injection d'apéline-17 par voie centrale induit une diminution rapide de la sécrétion d'AVP dans la circulation sanguine et entraîne une diurèse aqueuse chez le rat (Reaux *et al.*, 2001 ; De Mota *et al.*, 2004). Il a aussi été montré dans le plasma de rat déshydraté que l'augmentation de la sécrétion d'AVP s'accompagne d'une diminution des taux d'apéline (De Mota *et al.*, 2004). Enfin, il a été observé que les souris déficientes en récepteur APJ boivent moins d'eau et possèdent une capacité accrue à concentrer leurs urines (Roberts *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données a ainsi démontré le rôle physiologique de l'apéline dans le contrôle de l'homéostasie de l'équilibre hydrominéral. De par son expression au niveau de certains noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, un rôle du système apélinergique au niveau de cette régulation a également été supposé. Cependant, cette hypothèse est encore largement en cours de débat au vu des nombreuses données expérimentales contradictoires. Ainsi, l'injection intracerebroventriculaire (ICV) de 30 nmol de pGlu-apéline-13 n'a pas d'effet sur la prise alimentaire du rat nourri *ad libitum*, tandis qu'elle augmente la prise alimentaire à court terme des animaux à jeun sans pour autant avoir un effet sur la prise alimentaire cumulée sur 24 h (Taheri *et al.*, 2002). Une autre étude a

montré que l'injection ICV de 1-3 nmol d'apéline-13 induit une réduction de la prise alimentaire chez le rat à jeun et nourri *ad libitum*, mais l'injection intraveineuse de 10 nmol d'apéline-13 n'altère pas la prise alimentaire chez le rat dans ces deux conditions (Sunter *et al.*, 2003). Ces résultats semblent donc indiquer que l'apéline aurait une action sur la prise alimentaire au niveau central mais que l'apéline circulante n'a pas d'effet sur ces régulations. Encore plus surprenant, l'injection ICV d'apéline-12 semble également avoir une action au niveau de la prise alimentaire, ce qui ajoute un niveau de complexité supplémentaire aux données précédentes. O'hara et ses collaborateurs ont ainsi montré que l'injection ICV d'apéline-12 durant la phase nocturne diminue la prise alimentaire durant la nuit, tandis que l'injection durant le jour semble au contraire l'augmenter, sans pour autant modifier la prise alimentaire globale sur une période de 24 h (O'Shea *et al.*, 2003). Le décalage de la prise alimentaire suggère donc que l'apéline-12 exercerait une action sur le rythme circadien du rat. Les effets de l'apéline, au niveau central, semblent également avoir des répercussions sur le poids de l'animal puisque l'injection chronique ICV d'apéline-13 pendant 10 jours, augmente la prise alimentaire et la masse corporelle chez des souris (Valle *et al.*, 2008). Des études complémentaires sont attendues afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'apéline sur le comportement alimentaire et l'adiposité puisqu'une étude a montré que l'injection intra-péritonéale d'apéline-13 durant 7 jours chez la souris ne module pas la prise alimentaire alors qu'elle diminue l'adiposité. Cet effet semble en partie lié à l'augmentation de l'expression de la protéine découplante mitochondriale UCP1 dans le tissu adipeux brun, qui pourrait générer une thermogenèse plus importante et augmenter la dépense énergétique (Higuchi *et al.*, 2007). Ce résultat suggère donc que l'apéline va également exercer son action en périphérie notamment via une régulation de la thermogenèse.

ii. Fonctions périphériques du couple apéline/APJ

Comme indiqué dans la figure 18, le système apélinergique possède des fonctions très diverses et variées, notamment dans la régulation du système cardiovasculaire, du système digestif et du métabolisme énergétique. Le récepteur APJ a été également identifié chez l'Homme, comme étant un co-récepteur probable de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Choe *et al.*, 1998 ; Edinger *et al.*, 1998). Cependant, l'APJ seul n'est pas suffisant pour aboutir à l'infection et nécessite l'action du récepteur CD4, une protéine de surface déterminant majoritairement la pathogénicité du VIH. En tant

qu'agoniste naturel du récepteur APJ, l'apéline réduit donc l'entrée du virus dans les cellules (Cayabyab *et al.*, 2000). Ce degré d'inhibition étant plus élevé pour les molécules d'apéline de grande taille (Zou *et al.*, 2000).

De nombreuses données indiquent également que l'apéline est impliquée dans la régulation de l'angiogenèse. Des études ont montré que le couple apéline/APJ est fortement détecté dans toute les zones vasculaires de l'embryon au sein desquelles d'importants phénomènes d'angiogenèse ont lieu comme les vaisseaux entourant l'œil, l'axe aorte-gonade-mesonephros et les bourgeons des pattes (Devic *et al.*, 1999 ; Kälin *et al.*, 2007a ; Kidoya *et al.*, 2008). Cette expression est très élevée au cours des 15 premiers jours de vie, puis est très fortement réduite à l'âge adulte (Saint-Geniez *et al.*, 2003 ; Kasai *et al.*, 2008 ; Takakura et Kidoya, 2009). Une étude récente a montré que les cellules endothéliales embryonnaires cultivées en présence d'apéline ont une prolifération augmentée d'un facteur 3 (Kidoya *et al.*, 2008). D'autres expériences ont montré que l'apéline possède des propriétés pro-angiogéniques semblables à celles du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Ainsi, les formes d'apéline-13 et d'apéline-36 entraînent après 24 h de traitement dans des cultures de cellules endothéliales, la formation de structures tubulaires (Kasai *et al.*, 2004). L'inactivation du gène de l'apéline chez la souris retarde la vascularisation de la rétine et diminue l'action de deux molécules pro-angiogéniques : le VEGF et le *Fibroblast Growth Factor* (FGF). Un traitement de ces souris par de l'apéline restaure la réponse aux facteurs angiogéniques, ce qui suggère que l'apéline exerce un rôle important dans l'action pro-angiogénique de ces molécules (Kidoya *et al.*, 2008). Enfin, il a été montré que le couple apéline/APJ régule également le diamètre des vaisseaux sanguins lors de l'angiogenèse puisque l'inactivation du gène de l'apéline diminue le diamètre des vaisseaux intersomatiques durant l'embryogenèse sans entraîner de différence à l'âge adulte (Kidoya *et al.*, 2008). Au niveau endothélial, l'apéline est également capable d'induire, *via* son action sur l'*endothelial nitric-oxyde synthase* (eNOS), la synthèse du NO, qui est connu pour participer à l'activation ou à l'inhibition des phénomènes angiogéniques (Tatemoto *et al.*, 2001 ; Jones *et al.*, 2004). Les mécanismes moléculaires permettant de contrôler le système apélinergique au cours de l'angiogenèse sont peu connus. Cependant, plusieurs travaux ont montré que l'hypoxie est capable d'induire la synthèse d'apéline par l'intermédiaire de l'*hypoxia inducible factor* (HIF) dans des cultures cellulaires d'adipocytes blancs (Glassford *et al.*, 2007), de cardiomyocytes (Ronkainen *et al.*, 2007) et d'entérocytes (Han *et al.*, 2008). Ainsi, il n'est pas

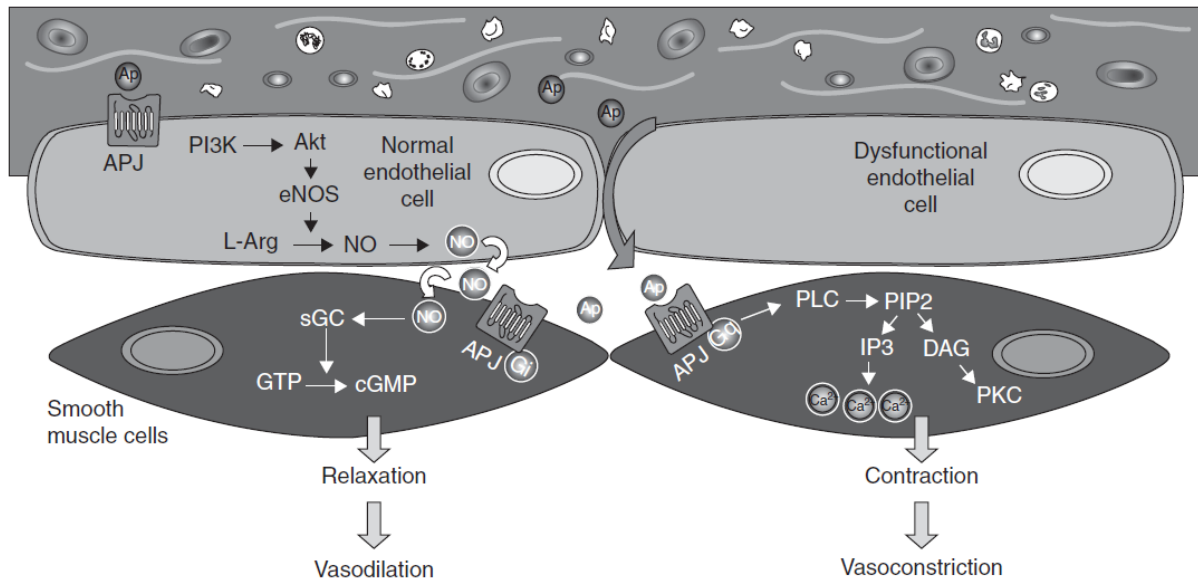


Figure 19 : Effet du système apélinergique sur le tonus vasculaire en absence et en présence de dysfonctions endothéliales. L'apéline va se fixer sur le récepteur APJ présent sur la membrane des cellules endothéliales. Ceci va entraîner la production et la libération de NO dans les cellules musculaires lisses, ce qui va induire une vasodilatation. Par contre, en présence de dysfonctionnements endothéliaux, l'apéline va se fixer sur son récepteur présent sur les cellules musculaires lisses et induire une vasoconstriction. *Akt* : Akt protein ; *Ap* : Apelin ; *APJ* : Apelin receptor ; *cGMP* : Cyclic guanosine monophosphate ; *DAG* : Diacylglycerol ; *eNOS* : Endothelial nitric oxide synthase ; *Gi* : Inhibitory G protein ; *Gq* : Gq protein ; *GTP* : Guanosine triphosphate ; *IP3* : Inositol-3,4,5-trisphosphate ; *L-Arg* : L-arginine ; *NO* : Nitric oxide ; *PIP2* : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; *PI3K* : Phosphoinositide 3-kinase ; *PLC* : Phospholipase C ; *sGC* : Soluble guanylate cyclase. D'après (Falcão-Pires *et al.*, 2010).

étonnant que l'hypoxie et HIF jouent également des rôles importants dans l'augmentation de l'expression de l'apéline dans les cellules endothéliales (Eyries *et al.*, 2008). De par ses propriétés pro-angiogéniques, le système apélinergique est fortement retrouvé au niveau des tumeurs cancéreuses et il a été proposé qu'il puisse jouer un rôle important dans les phénomènes de progression tumorale. Certains auteurs pensent que ce système pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers (Kälin *et al.*, 2007b ; Sorli *et al.*, 2007).

Le système apélinergique possède un rôle important dans la régulation de la pression sanguine et du tonus vasculaire. En effet, l'injection intraveineuse d'apéline induit très rapidement et sur un laps de temps court, une diminution de la pression artérielle moyenne. Cet effet est d'autant plus important que le peptide injecté est de courte taille (Tatemoto *et al.*, 2001). L'action hypotensive de l'apéline est médiée principalement par la formation de NO *via* l'enzyme endothéliale eNOS (Ishida *et al.*, 2004). Le NO produit par les cellules endothéliales diffuse jusqu'aux cellules musculaires lisses composant la paroi vasculaire (Figure 19). À ce niveau, il va activer la guanylate cyclase et provoquer la transformation de guanoside triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPC) dont l'augmentation est responsable de la modulation de l'activité de certaines protéines kinases. Ces enzymes vont provoquer une hyperpolarisation membranaire par la sortie de potassium et de calcium hors de la cellule, ce qui aura pour conséquence une relaxation des fibres musculaires lisses des vaisseaux sanguins. À l'inverse, l'apéline pourra également avoir une action sur le tonus vasculaire en agissant directement sur son récepteur présent au niveau des cellules musculaires lisses. Il a ainsi été montré que l'apéline-13 induit la contraction de ces cellules sur des artères humaines dénuées de cellules endothéliales, ce qui aboutit à une vasoconstriction (Katugampola *et al.*, 2001). Dans ce cas, l'apéline va induire la phosphorylation des résidus thréonine et sérine en position 18 et 19 respectivement au niveau des chaînes lourdes de myosine responsables de la contraction des cellules musculaires lisses (Hashimoto *et al.*, 2006).

Effet sur le métabolisme

Une étude récente a montré une augmentation des taux circulants d'acides gras et de glycérol chez la souris déficiente en apéline, tandis que l'injection de pGlu-apélin-13 inhibe la lipolyse (Yue *et al.*, 2011). Cependant, l'effet de l'apéline sur le métabolisme lipidique n'est

pas clairement compris puisqu'une autre étude chez l'Homme indique que l'apéline n'a pas d'action sur la lipolyse (Attané *et al.*, 2011). L'injection chronique intrapéritonéale d'apéline diminue la masse de différents dépôts de tissus adipeux blancs chez la souris (Higuchi *et al.*, 2007). Ces auteurs ont montré que ces effets ne sont pas dus à des perturbations de la prise alimentaire mais plutôt à une augmentation de la dépense énergétique basale *via* une augmentation de l'expression des protéines découplantes dans le muscle et le tissu adipeux ainsi qu'à une augmentation de la température corporelle. En accord avec ces données, d'autres auteurs ont montré chez le rat que l'injection chronique d'apéline-13 dans ces mêmes conditions, augmente l'activité musculaire de trois enzymes mitochondriales clés impliquées dans le métabolisme énergétique (*citrate synthase*, *hydroxyacyl-coA deshydrogenase* et *cytochrome C oxydase*), et ce, *via* un mécanisme lié à l'expression de *peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 β* (PGC-1 β) (Frier *et al.*, 2009). Ces auteurs ont également montré que l'apéline va augmenter l'expression de sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'apéline pourrait avoir une action à la fois sur la biogenèse et la fonction respiratoire mitochondriale. D'autres auteurs ont montré, chez des souris transgéniques, que l'expression du gène humain de l'apéline, diminue les effets néfastes d'un régime riche en graisse *via* une augmentation de la dépense énergétique et de la biogenèse mitochondriale dans le muscle, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'obésité (Yamamoto *et al.*, 2011).

L'apéline présente également des actions sur le métabolisme glucidique. L'injection intraveineuse d'apéline-36 diminue la sécrétion d'insuline pancréatique suite à une stimulation par le glucose (Sörhede Winzell *et al.*, 2005). Ces résultats ont été confirmés *in vitro* sur une lignée cellulaire β -pancréatique en culture (Guo *et al.*, 2009). Cependant, une récente étude sur des îlots pancréatiques humains montre que l'apéline présente une réponse bi-phasique sur la sécrétion d'insuline. À faible dose, l'apéline-36 va induire une diminution de la sécrétion d'insuline, tandis qu'à forte dose l'apéline semble au contraire l'augmenter. Ces résultats pourraient expliquer en partie les doses importantes d'apéline retrouvées chez les patients présentant une hyperinsulinémie (Ringström *et al.*, 2010) et un diabète de type 2 (Dray *et al.*, 2010). Cependant, une autre étude a montré chez la souris que l'injection intraveineuse de faible dose d'apéline diminue la glycémie et potentialise l'action de l'insuline. Cette étude a également montré que l'apéline seule induit une augmentation de la captation du glucose par le muscle (Dray *et al.*, 2008). Plusieurs études ont également rapporté cette même action au

niveau de l'adipocyte en condition normale (Attané *et al.*, 2011) ou insulino-résistant (Zhu *et al.*, 2011).

d) Pourquoi étudier le couple apéline/APJ durant la gestation ?

Nous nous sommes intéressés au système apélinergique pour différentes raisons. La première est que ce système a été peu étudié au cours de la gestation et que le placenta est l'un des organes qui exprime le plus l'ARNm de l'apéline et son récepteur. De plus, les concentrations plasmatiques d'apéline chez le nouveau-né sont plus élevées que celles observées chez leurs mères, ce qui suggère un rôle important de l'apéline durant le développement fœtal (Malamitsi-Puchner *et al.*, 2007).

Ensuite, le système apélinergique semble avoir comme nous l'avons vu précédemment un puissant rôle angiogénique. Des problèmes de vascularisation placentaire ayant été montrés dans le cadre de RCIU, cette fonction fait de ce système une cible de choix dans l'étude des perturbations de la croissance placentaire et fœtale.

Enfin, il existe des liens forts entre le statut nutritionnel et énergétique et le système apélinergique. Par exemple, il a été montré que les taux circulants d'apéline sont proportionnels à l'IMC et que ces taux sont plus élevés chez les personnes obèses (Boucher *et al.*, 2005) et en obésité morbide (Soriguer *et al.*, 2009). Une corrélation positive, entre les taux circulants d'apéline et les taux de glucose et de triglycérides, a aussi été rapportée (Soriguer *et al.*, 2009). Enfin, le taux d'apéline plasmatique est diminué chez des personnes obèses après la pose d'un anneau gastrique (Heinonen *et al.*, 2005) ou par un régime hypocalorique (Castan-Laurell *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données métaboliques font que l'expression du système apélinergique pourrait être perturbée dans notre modèle de RCIU et pourrait potentiellement contribuer aux effets délétères de ce régime sur le développement du placenta et du fœtus.

e) Objectifs

Cette étude a été l'occasion pour nous d'effectuer une étude plus approfondie du régime FR30 sur le développement foeto-placentaire et plus particulièrement en ce qui concerne les paramètres métaboliques maternels durant la gestation. Nous avons focalisé notre étude sur le dernier tiers de la gestation, période qui correspond à la phase exponentielle de croissance fœtale. Cette partie se décomposera en 3 étapes. La première consiste en la mesure de différents paramètres chez les mères, les fœtus et dans les placentas témoins et FR30. Des mesures de masses maternelles, fœtales et placentaires ont ainsi été effectuées durant cette période ainsi que des dosages de glucose, triglycérides et cholestérols circulants lorsque cela a été possible chez la mère et ses fœtus et qui serviront d'indicateurs de l'environnement nutritionnel gestationnel. Dans un deuxième temps, une évaluation des surfaces placentaires a été réalisée afin de voir l'effet de la dénutrition maternelle sur le développement de cet organe. Enfin, dans un troisième temps, une étude complète du système apélinergique a été effectuée durant cette période. Pour cela des mesures d'apéline plasmatiques ont été effectuées à la fois chez les mères et leurs fœtus. Ensuite, par une analyse de qRT-PCR, nous avons étudié l'expression du système apélinergique dans les placentas de rat. La localisation de l'expression de ce couple a été effectuée par des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie.

La dernière partie de cette étude se concentrera, comme pour l'étude du BDNF, sur l'expression placentaire de l'apéline dans des échantillons humains provenant de grossesses normales ou pathologiques (diabète de type 1 sans altération de la croissance fœtale) ou encore ayant entraîné la naissance de RCIU et de macrosomes.

II. Matériels & Méthodes

Les techniques utilisées pour cette section ayant été décrites dans les parties précédentes, je ne détaillerai que brièvement le protocole opératoire.

a) Ontogenèse sur le modèle FR30

Dans cette étude, nous avons utilisé le même modèle que pour l'étude de protéomique placentaire et qui consiste en une réduction de 70 % de la ration alimentaire quotidienne des rates durant les 3 semaines de gestation. Brièvement, des femelles Wistar vierges de 280 g (Laboratoire Janvier, L'arbresle, France) sont élevées par groupe de 5 dans des conditions contrôlées de température (22 ± 2 °C) et de cycles lumineux (12 h de lumière à partir de 07 h 00). Ces rates ont libre accès à de l'eau et à la nourriture (SAFE 04, 2900 cal/g, contenant 16 % de protéines, 3 % de lipides et 60 % de glucides ; UAR, Augy, France). Après 14 jours d'acclimatation, les femelles sont mises en reproduction avec un mâle durant la nuit. Le lendemain matin, la présence de spermatozoïdes est vérifiée au microscope optique (objectif x40) après lavage vaginal à l'eau physiologique. Si la présence est confirmée, ce jour est défini comme le premier jour de gestation (E0). Ces femelles gestantes sont alors transférées dans des cages individuelles où elles auront un accès libre à l'eau. À ce stade, deux groupes distincts de femelles seront étudiés. Les femelles contrôles (C) auront un accès *ad libitum* à la nourriture de E1 jusqu'au sacrifice, tandis que les femelles (FR30) auront une ration de 7,2 g par jour durant cette même période. Le sacrifice s'effectuera à 3 âges gestationnels différents : E13, E17 et E21.

Afin de déterminer si les taux d'apéline circulants sont modulés à la fois par la gestation et par le statut nutritionnel chez le rat, une étude du modèle FR30 sur des femelles non gestantes a également été effectuée. Ces femelles ont été sacrifiées après 21 jours de ce régime alimentaire.

Tableau 7 : Paramètres des amorces utilisées pour la qRT-PCR.

Rat					
Gène	Amorce		Température d'amplification (°C)	Taille de l'amplicon	Genbank
	Séquence (S)	Séquence (AS)			
<i>Apln</i>	5'-ATG AAT CTG AGT TTC TGC GTG CA-3'	5'-GAG GCA GCA TCA GTG GCA CTC C-3'	64	85	NM_031612
<i>Aplnr</i>	5'-CCT TCA TCA TCA TGC TGA CCT GTT A-3'	5'-GGT GGT AAG GCA TCC AGC ACA G-3'	64	159	NM_031349
<i>Ppib</i>	5'-TTT CGG CAA AGT TCT GGA AGG CA-3'	5'-CTT GCC ACA GTC TAC AAT GAT CAC A-3'	60	109	NM_022536
<i>Hprt1</i>	5'-GTG TCA TCA GCG AAA GTG GA-3'	5'-ATG GCC ACA GGA CTA GAA CG -3'	60	123	NM_012583
Homme					
Gène	Amorce		Température d'amplification (°C)	Taille de l'amplicon	Genbank
	Séquence (S)	Séquence (AS)			
<i>APLN</i>	5'-TTC TGA AGC AGG ACT GAA GGG-3'	5'-GCT ACA GCA GGT GCG AGG TG-3'	62	124	NM_017413
<i>APLNR</i>	5'-AGC AGG GCT GAT GAA TGG ATG T-3'	5'-GCC AAG CAG TGT CTG GAC TAA AT-3'	62	117	NM_005161
<i>PPIB</i>	5'-GGA GAC GAA CCT GTA GGA CGA GTG A-3'	5'-CTT GCC ACA GTC TAC AAT GAT CAC A-3'	60	99	NM_000942
<i>Ppib</i> (CycloB), peptidylprolyl isomerase B; <i>Hprt1</i> , hypoxanthine phosphoribosyltransferase I; <i>Apln</i> , apéline; <i>Aplnr</i> , récepteur APJ.					

b) Sacrifices et prélèvements de tissus

Les femelles sont rapidement pesées et sacrifiées par décapitation entre 09 h 00 et 10 h 00. Les placentas ainsi que les fœtus sont collectés par césarienne puis pesés et le sexe des fœtus à E21 est déterminé avant décapitation. Seul les fœtus et placentas mâles ont été étudiés. Le sang maternel et fœtal a été collecté dans des tubes froids contenant une solution à 5 % d'EDTA puis centrifugés à 4 000 g durant 10 min à 4°C. Le sang des fœtus à E13 n'a pas pu être prélevé en raison de la taille trop faible des embryons. Le sang des fœtus à E17 a été prélevé et poolé par portée. En ce qui concerne les fœtus à E21, seul le sang des fœtus mâles a été prélevé. Chacune des mesures a été faite sur un nombre limité d'animaux et de placentas provenant de la même portée (n = 1-2 par portée). Des prélèvements de placentas et de triangles mésométriaux (TM) (zone déciduale transitoire d'épaississement de la paroi utérine qui entoure les ramifications des vaisseaux sanguins maternels entrant dans le placenta) ont été effectués puis congelés rapidement dans l'azote liquide. Une partie des placentas a été cryo-protégée pour les mesures histologiques. Pour cela, les placentas ont été fixés 48 h à 4°C dans une solution de paraformaldehyde à 4 % et 0,1 M de PBS à pH 7,4. Ces placentas sont ensuite placés dans une solution de sucrose à 20 % et 0,1 M de TBS à pH 7,4 puis stockés à sec à -20°C.

c) RT-PCR quantitative

Les ARN totaux provenant des placentas et des TM ont été isolés de la même façon que dans les études précédentes et la PCR en temps réel a été effectuée sur un appareil Light Cycler 480 (Roche) grâce à la technologie du SYBR green (SYBR Green I master, Roche). Ces expériences ont été réalisées suivant les recommandations du fournisseur et à une température d'amplification de 60°C. Deux gènes constitutifs différents (cyclophiline B et hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) ont été utilisés afin de normaliser les données. Les amorces utilisées sont décrites dans le tableau 7.

d) Dosage de l'apéline plasmatique par ELISA

Les dosages d'apéline plasmatique ont été effectués avec un kit ELISA (Phoenix Pharmaceutical, Burlingame, CA). La sensibilité de ce dosage est de 0,2 ng/ml et les erreurs intra-dosage < 5 %. Ce dosage présente 100 % de réactions croisées avec formes d'apéline-12, apéline-13 et apéline-36 et ne permet donc pas de discerner ces différentes formes moléculaires de l'apéline. Ces dosages ont été effectués en collaboration avec le Dr Claude Knauf de Toulouse

e) Hybridation in situ

Les placentas et les fœtus de rats cryo-protégés ont été coupés à l'aide d'un cryostat à une épaisseur de 10 µm. L'hybridation *in situ* a été réalisée comme décrite précédemment (Mayeur *et al.*, 2010). Une fois créées, les sondes d'hybridation ont été amplifiées puis sous-clonées dans le plasmide pGEM-T easy (Promega). Les ribosondes ont une taille respective de 239 nucléotides pour l'apéline et 460 nucléotides pour APJ. Ces sondes ont ensuite été linéarisées grâce au Sp6/T7 Transcription Kit (Roche) puis marquées radioactivement avec du [³⁵S]-dUTP (1 300 Ci/mmol, Amersham Biosciences). Les coupes ont été exposées au contact d'un film X-ray Biomax-MR (Kodak) durant 5 semaines avant la révélation du film.

f) Étude de l'expression placentaire du système apélinergique chez l'Homme

Des placentas provenant de grossesses normales et pathologiques ont été collectés, dans les règles de consentement et d'éthique, après césarienne dans différentes maternités de Paris et de Lille. Pour cette étude, le critère d'inclusion des placentas dans le groupe RCIU utilisé est un poids de naissance < 10^{ème} percentile. Le groupe RCIUV correspond à des naissances présentant un RCIU associé avec une pathologie vasculaire au niveau de l'artère utérine et qui a été mise en évidence par Doppler durant le premier ou le second trimestre de grossesse. Enfin, un troisième groupe appelé PER représente un groupe de naissances présentant un RCIU associé à une pré-éclampsie. Dans cette étude, nous avons également inclus les placentas provenant de grossesses ayant donné naissance à des enfants macrosomes précédemment utilisés dans l'étude sur le BDNF. Le groupe de macrosomes a été choisi d'après les critères de la courbe de croissance standard de la population française (Mamelle *et*

al., 1996). Nous avons également pu inclure des placentas provenant de mères présentant un diabète de type 1.

g) Analyses statistiques

Toutes les données sont présentées avec la moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM). La comparaison entre les groupes a été faite grâce au test ANOVA à une voie et au test de Dunnett. Le seuil de significativité retenu est de $p < 0,05$. La significativité des résultats est notée par les symboles suivants : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Tableau 8 : Ontogenèse des paramètres materno-fœtaux dans le modèle FR30.

	E13			E17			E21		
	Contrôle	FR30	P	Contrôle	FR30	P	Contrôle	FR30	P
Poids maternel (g)	385 ± 19	282 ± 6	***	440 ± 10	271 ± 4	***	463 ± 11	316 ± 11	***
Glycémie maternelle (mmol/l)	-	-	-	-	-	-	4,87 ± 0,20	4,02 ± 0,17	**
Triglycéride plasmatique maternel (g/l)	1,27 ± 0,07	0,77 ± 0,12	**	2,09 ± 0,33	0,97 ± 0,06	**	1,86 ± 0,35	0,73 ± 0,21	*
Cholestérol plasmatique maternel (g/l)	0,560 ± 0,035	0,322 ± 0,043	**	0,760 ± 0,071	0,358 ± 0,026	***	0,771 ± 0,100	0,564 ± 0,049	*
Ratons par portée	-	-	-	-	-	-	12,1 ± 1,7	11,6 ± 0,7	NS
Ratio mâles/femelles	-	-	-	-	-	-	1,01 ± 0,18	1,10 ± 0,13	NS
Poids fœtal (g)	0,079 ± 0,002	0,070 ± 0,002	***	0,842 ± 0,008	0,686 ± 0,010	***	5,56 ± 0,07	3,97 ± 0,16	***
Taille des fœtus (mm)	-	-	-	-	-	-	45,9 ± 0,4	42,7 ± 0,6	***
Glycémie fœtale (mmol/l)	-	-	-	-	-	-	7,44 ± 0,78	4,33 ± 0,52	*
Triglycéride plasmatique fœtal (g/l)	-	-	-	0,842 ± 0,046	0,646 ± 0,046	*	0,467 ± 0,079	0,382 ± 0,060	NS
Cholestérol plasmatique fœtal (g/l)	-	-	-	0,862 ± 0,061	0,582 ± 0,071	*	0,476 ± 0,084	0,362 ± 0,040	NS
Poids placentaire (mg)	117 ± 6	79 ± 3	***	406 ± 14	349 ± 10	**	592 ± 17	443 ± 19	***
Ratio fœtus/placenta	0,710 ± 0,044	0,926 ± 0,050	***	2,16 ± 0,08	2,08 ± 0,05	NS	9,22 ± 0,16	8,42 ± 0,23	***
Aire placentaire (mm ²)	-	-	-	27,7 ± 1,3	19,0 ± 0,8	*	37,4 ± 1,6	30,4 ± 1,8	*
Décidua valeur absolue (mm ²)	-	-	-	1,91 ± 0,20	1,14 ± 0,04	*	2,49 ± 0,10	2,38 ± 0,41	NS
Décidua valeur relative (%)	-	-	-	6,85 ± 0,07	6,07 ± 0,42	NS	6,72 ± 0,35	8,92 ± 1,16	*
Trophospongium valeur absolue (mm ²)	-	-	-	9,36 ± 0,53	7,41 ± 0,48	*	4,52 ± 0,25	5,92 ± 0,96	NS
Trophospongium valeur relative (%)	-	-	-	33,8 ± 1,1	39,3 ± 3,2	NS	12,5 ± 0,7	20,7 ± 2,2	**
Labyrinthe valeur absolue (mm ²)	-	-	-	16,4 ± 0,7	10,4 ± 1,0	***	28,7 ± 1,1	22,1 ± 1,4	**
Labyrinthe valeur relative (%)	-	-	-	59,3 ± 1,1	54,6 ± 3,5	NS	80,8 ± 0,7	70,4 ± 1,4	**

III. Résultats

a) *Quelles sont les conséquences de la dénutrition maternelle de 70 % sur la croissance placentaire et fœtale ?*

Dans un premier temps, nous avons voulu voir l'effet de ce régime alimentaire chez la rate gestante (Tableau 8). Alors, que les rates témoins prennent du poids tout au long de la gestation (environ +100 g de E1 à E13 puis +180 g de E13 à terme), les rates FR30 ne présentent qu'une légère augmentation de leur masse corporelle en fin de gestation (environ +36 g à E21). Cette donnée indique que les réserves énergétiques de la mère sont fortement mises à contribution afin d'assurer le développement fœtal. Cette information est confirmée lors du sacrifice des rates FR30 à terme puisque leurs principaux dépôts graisseux (tissus adipeux périrénal et périgonadique) sont presque inexistantes (donnée non montrée). Ceci se traduit également chez les mères FR30 par des taux circulants de triglycérides et de cholestérols diminués aux trois stades étudiés ainsi que par une baisse de la glycémie à E21. Par conséquent, il n'est pas étonnant que cette dénutrition maternelle drastique aboutisse à un RCIU très précoce chez les fœtus FR30. En effet, à E13, alors que les fœtus témoins ne pèsent que quelques dizaines de milligrammes, les fœtus FR30 présentent déjà un retard significatif de croissance d'environ 12 %. Ce retard s'accroît au 17^{ème} jour de la gestation (E17) pour atteindre 18 %. Puis en fin de gestation, alors que le gain de masse est maximal pour les fœtus témoins, le déficit pondéral des animaux FR30 atteint 29 %, et peut atteindre 35 % pour certains fœtus (Tableau 8 et Figure 20). Il est également intéressant de noter que malgré cet environnement délétère pour la croissance des fœtus, il n'est observé aucune différence dans la taille des portées et dans le ratio mâle/femelle.

La croissance du fœtus étant fortement liée à la croissance placentaire. Nous pouvons envisager qu'un déficit pondéral placentaire du même ordre soit dans le groupe FR30. Cependant, nos données démontrent que ce n'est pas le cas (Tableau 8 et Figure 20). Ainsi, le déficit pondéral des placentas est maximal à E13 (32 %). Il diminue ensuite à E17 (14 %) et s'accroît ensuite légèrement au terme de la gestation (22 %). Ces changements brusques des valeurs de retard de croissance placentaire peuvent s'expliquer par des différences de maturité du placenta. En effet, le placenta de rates dénutries peuvent présenter, à E13, un retard de

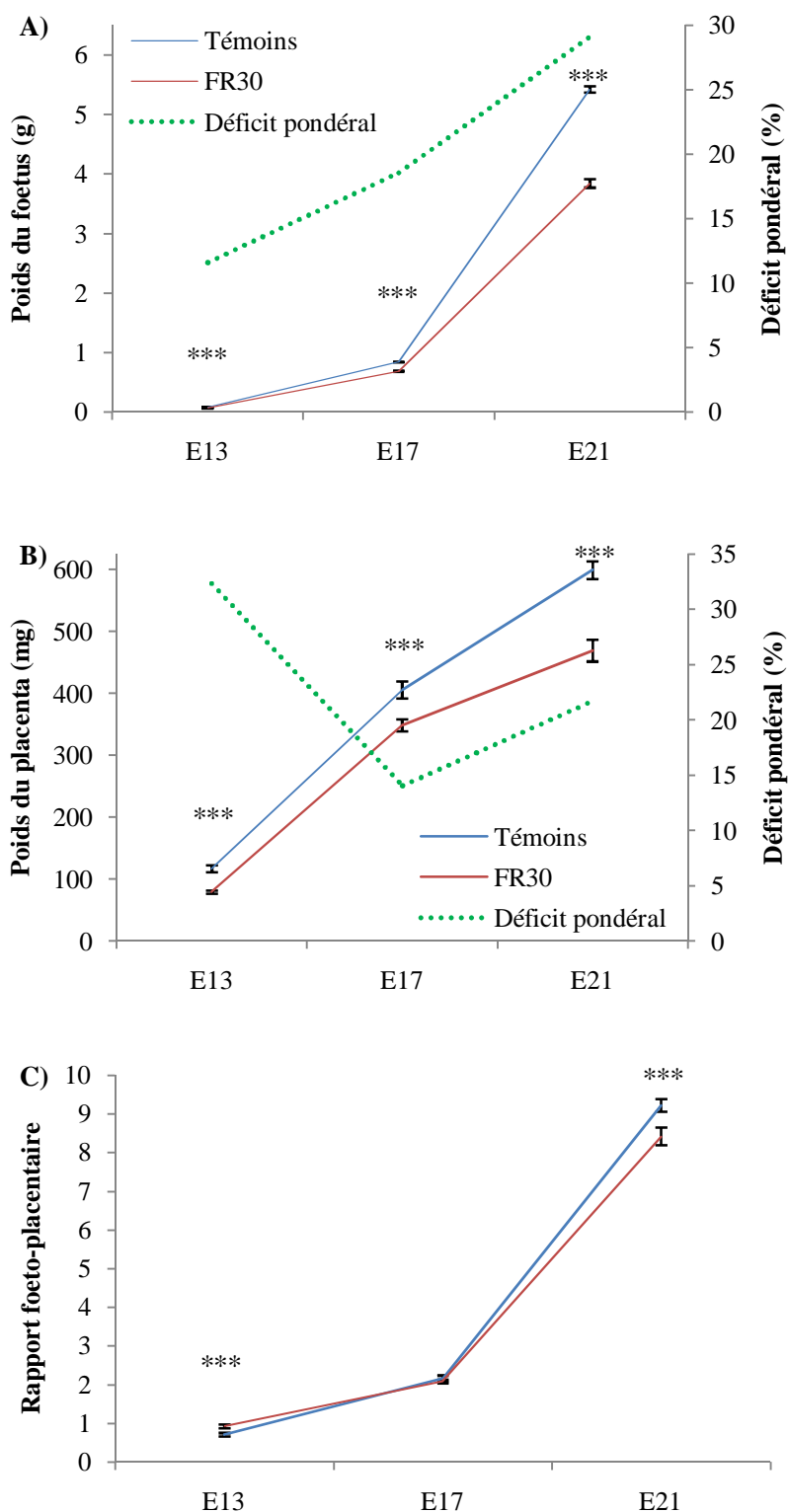


Figure 20 : Impact de la dénutrition maternelle sur le poids des fœtus (A), du placenta (B) et sur le rapport fœto-placentaire (C) au 13^{ème}, 17^{ème} et 21^{ème} jour de gestation (respectivement E13, E17, E21). **Témoins : alimentation *ad libitum* durant les 21 jours de gestation. **FR30** : restriction alimentaire de 70 % durant toute la gestation. Sur chaque graphique est représenté le pourcentage de déficit pondéral (pointillé vert) des animaux FR30 par rapport aux témoins. Ces données représentent la moyenne \pm SEM. *** $P < 0,001$; FR30 *versus* témoins.**

maturité, à l'origine de ce déficit pondéral conséquent. Par la suite, les placentas FR30 pourraient rattraper partiellement leur maturité vers E17, leur permettant ainsi un gain de poids maximal entre E13 et E17. Cependant, les réserves de graisses maternelles étant trop faibles en fin de gestation pour répondre aux besoins importants du fœtus et à ceux du placenta, on observe à terme un déficit pondéral placentaire plus marqué qu'à E17. Il est également intéressant de noter à E17, une inversion des courbes des rapports fœto-placentaires, c'est à dire le rapport des poids de fœtus sur ceux des placentas.

Afin de vérifier des différences de maturité, des colorations de coupes placentaires ont été effectuées à ces trois stades différents. Ceci nous a permis de mesurer la taille des principales zones placentaires, et ainsi de distinguer un éventuel retard de maturité des placentas. Les placentas à E13 n'ont pas pu être analysés car leurs tailles sont trop faibles pour être analysés correctement et de façon reproductible. Comme pour la masse placentaire totale, la surface placentaire est significativement diminuée chez les fœtus FR30 (Tableau 8). Le labyrinthe est la zone placentaire où ont lieu les échanges materno-fœtaux et présente une surface absolue réduite à la fois à E17 et E21. Les surfaces absolues de la decidua et du trophospongium sont également réduites à E17. Cependant, les placentas FR30 semblent correctement proportionnés puisqu'aucune différence n'a été observée pour les mesures de surface relative à ce stade. À l'inverse, la surface relative du labyrinthe est diminuée à E21, les surfaces relatives du trophospongium ainsi que de la decidua dans les placentas à E21 sont quant à elles augmentées. L'ensemble de ces données est en accord avec de précédentes études dans différentes espèces qui montrent que la sous-nutrition maternelle a un impact important sur la surface du labyrinthe, sur l'épaisseur de la couche cellulaire qui compose la barrière fœto-placentaire ainsi que sur la composition cellulaire du placenta (Sibley *et al.*, 1997 ; Roberts *et al.*, 2001 ; Belkacemi *et al.*, 2010). Ce phénomène peut s'expliquer par un ralentissement de la croissance du labyrinthe, induit par la dénutrition maternelle, mais également par une apoptose plus importante dans le labyrinthe et le trophospongium comme il l'a été démontré dans un modèle de dénutrition chez le rat similaire au nôtre (Belkacemi *et al.*, 2009).

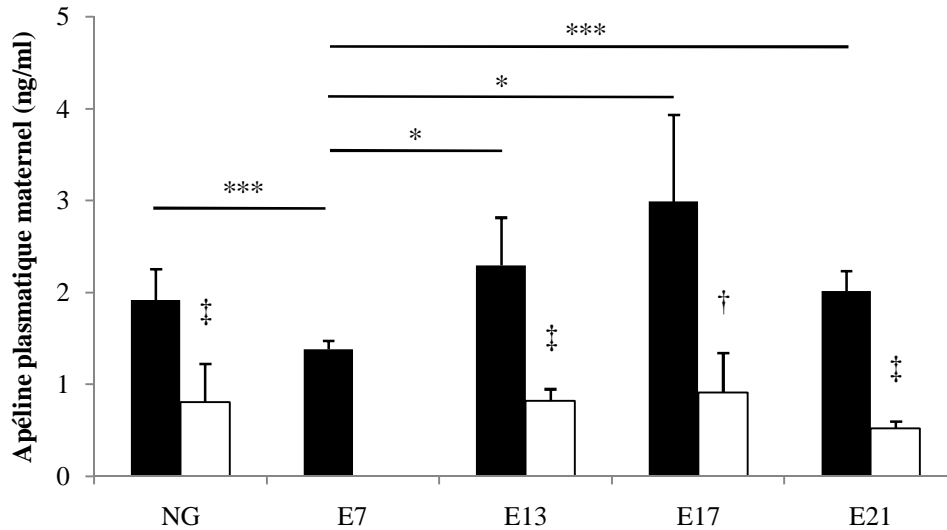


Figure 21 : Ontogénèse des taux d'apéline circulante maternelle durant la gestation. Les barres pleines représentent les animaux témoins (n = 5-9), tandis que les barres blanches correspondent au animaux FR30 (n = 4-5). NG signifie non gestante. Les femelles FR30-NG ont été analysées après 3 semaines de dénutrition. Aucune mesure n'a pu être effectuée au stade E7 chez les animaux FR30. Ces données représentent la moyenne \pm SEM. † $P < 0,05$; ‡ $P < 0,01$; FR30 versus témoins. * $P < 0,05$; *** $P < 0,01$; entre les témoins aux différents stades (test t , variables vérifiant la loi normale).

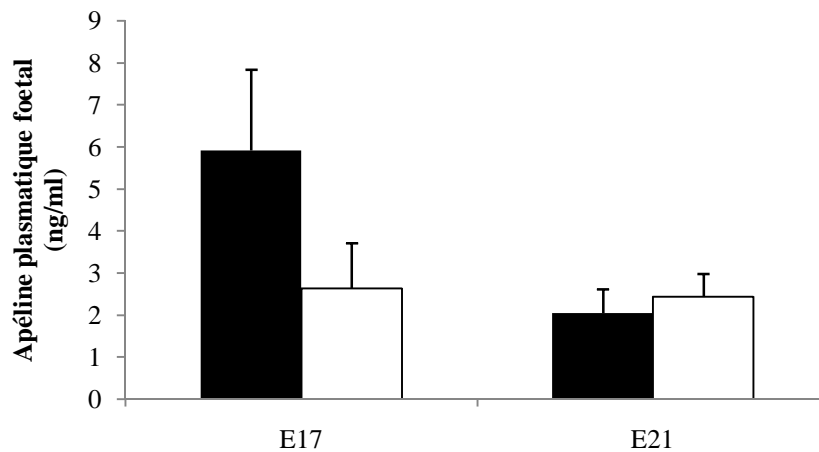


Figure 22 : Ontogénèse des taux fœtaux d'apéline circulante durant la gestation. Les barres pleines représentent les animaux témoins (n = 5), tandis que les barres blanches correspondent au animaux FR30 (n = 5). Ces données représentent la moyenne \pm SEM. Aucune différence significative n'a été retrouvée.

b) Quel est l'impact de la gestation et du modèle FR30 sur le système apélinergique ?

Afin de répondre à cette question, une ontogenèse de ce système a été réalisée. Cette étude a permis de confirmer les précédentes données montrant que les taux circulants d'apéline sont liés au statut nutritionnel. Nous avons en effet montré que la restriction calorique diminue dans les mêmes proportions les taux circulants d'apéline à la fois chez la rate non gestante et chez la rate gestante. (Figure 21). Ensuite cette étude montre que les taux d'apéline ne sont pas modulés au cours de la gestation, sauf pour le stade E7 auquel une légère diminution est observée.

Les taux circulants fœtaux ont également été mesurés en fin de gestation (Figure 22). Cependant, ces résultats ne sont que préliminaires en raison du faible nombre d'échantillons. Dans un premier temps, il est intéressant de noter que ces taux semblent être, au stade E17, plus élevés chez les fœtus que chez leurs mères. Au stade E21 par contre, les taux entre la mère et les fœtus sont comparables dans le groupe témoin mais sont significativement plus élevés chez les fœtus que chez la mère au sein du groupe FR30. La comparaison de ces valeurs entre nos deux groupes expérimentaux montre que les taux d'apéline chez les témoins sont fortement diminués en fin de gestation chez les fœtus. Cependant, cette variation n'est pas retrouvée chez les individus FR30.

À ce jour, l'origine de l'apéline fœtale circulante est inconnue et on ne sait pas si l'apéline d'origine maternelle est capable de traverser la barrière fœto-placentaire pour se retrouver dans le sang fœtal. Afin de préciser les sites d'expression de l'apéline et de son récepteur chez le fœtus, des hybridations *in situ* ont été effectuées. Nous avons pu observer, dans un premier temps, que le système apélinergique est exprimé par le fœtus, et ce, très tôt au cours du développement (Figure 23). En effet, ce couple est majoritairement exprimé au niveau des tissus cérébraux et cardiaques en développement à E13. À E17, l'apéline est globalement exprimée dans l'ensemble des tissus fœtaux. Cependant, certains tissus semblent l'exprimer plus fortement comme le foie, la surrénale, le cœur et les poumons. Par contre, le signal obtenu pour l'apéline semble plus faible chez le fœtus à E21, ce qui pourrait être en lien avec la diminution du taux d'apéline circulante observée chez le fœtus à E21. En ce qui concerne l'expression du récepteur APJ, celle-ci semble fortement retrouvée dans les organes du système cardio-vasculaire et respiratoire ainsi que du système digestif. Comme pour l'apéline, son expression est globalement diminuée à E21, cependant certains organes

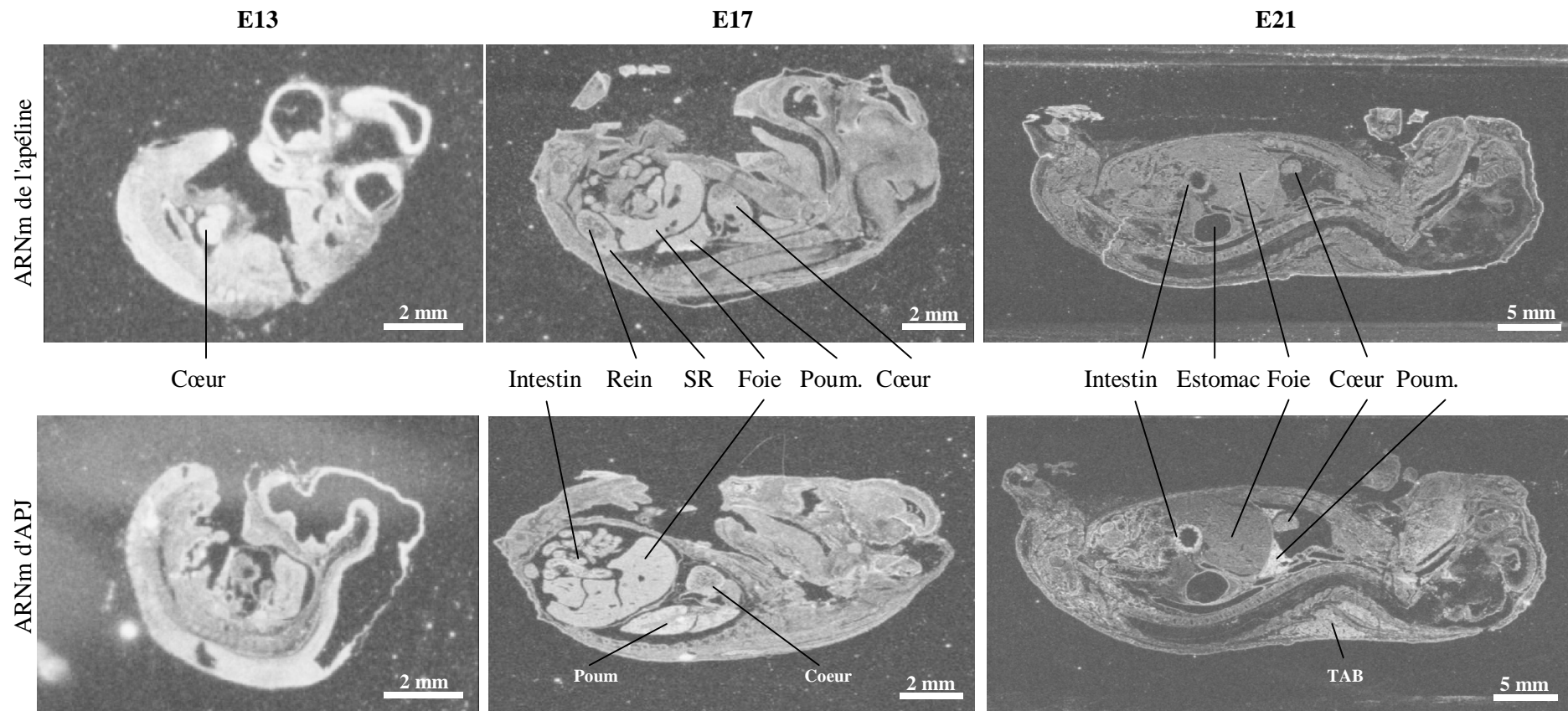


Figure 23 : Localisation de l'expression fœtale de l'apéline et de son récepteur par hybridation *in situ*. SR : surrénale ; Poum. : poumons ; TAB : Tissu adipeux brun.

l'expriment fortement comme l'intestin, le cœur et le poumon, ce qui suggère un rôle important de l'apéline à ces niveaux chez le nouveau-né. Il est également intéressant de constater que le couple apéline/APJ est exprimé au niveau du cerveau au cours du développement fœtal et que cette expression est fortement diminuée chez le fœtus à E21.

Le placenta pouvant également être une source potentielle d'apéline durant la gestation chez le rat, son expression au niveau de cet organe a été étudiée par qRT-PCR (Figure 24). Les résultats obtenus montrent que les taux d'apéline et de son récepteur sont fortement diminués au cours de la gestation de E13 à E21. En effet, l'expression placentaire d'apéline est diminuée de moitié à E21 comparativement à son taux à E13. Cette diminution coïncide avec la baisse des taux circulants de cette hormone chez le fœtus et sa mère, suggérant que le placenta pourrait sécréter cette hormone durant la gestation. Cette donnée suscite aussi un rôle possible de cette chute d'apelinémie en fin de gestation, notamment dans la mise en place des événements liés à la parturition et à la naissance des fœtus. Cette chute d'expression génique est également observée pour le récepteur APJ. L'expression placentaire du système apélinergique semble également être modifiée par le statut nutritionnel. En effet, le taux d'ARN messagers de l'apéline est significativement augmenté dans les placentas FR30 à E17. Le messenger de son récepteur est quant à lui plus élevé à E13, tandis qu'il est légèrement diminué à E21. Par cette technique, nous avons évalué l'expression du système apélinergique au niveau du triangle mésométrial (Figure 24), c'est à dire une zone transitoire de l'utérus qui correspond à un épaissement de la paroi utérine et qui entoure les ramifications des vaisseaux sanguins maternels entrant dans le placenta. Bien que peu étudié, un développement adéquat de cette zone est primordial puisque c'est là que se réalise la régulation du flux sanguin placentaire. L'expression génique du système apélinergique dans ce tissu est également modulée durant la gestation et comme pour le placenta, elle est diminuée pour l'apéline en fin de gestation. À l'inverse, une forte surexpression du récepteur APJ est observée au niveau du triangle mésométrial à E21. La dénutrition maternelle augmente l'expression de l'apéline à E17, tandis que l'expression d'APJ n'est pas significativement modulée. La localisation des ARNm de l'apéline et d'APJ a été effectuée par hybridation *in situ* et a permis de montrer que leur expression est retrouvée dans l'ensemble du placenta avec une transcription génique légèrement plus forte au niveau du trophospongium et de la decidua (Figure 25).

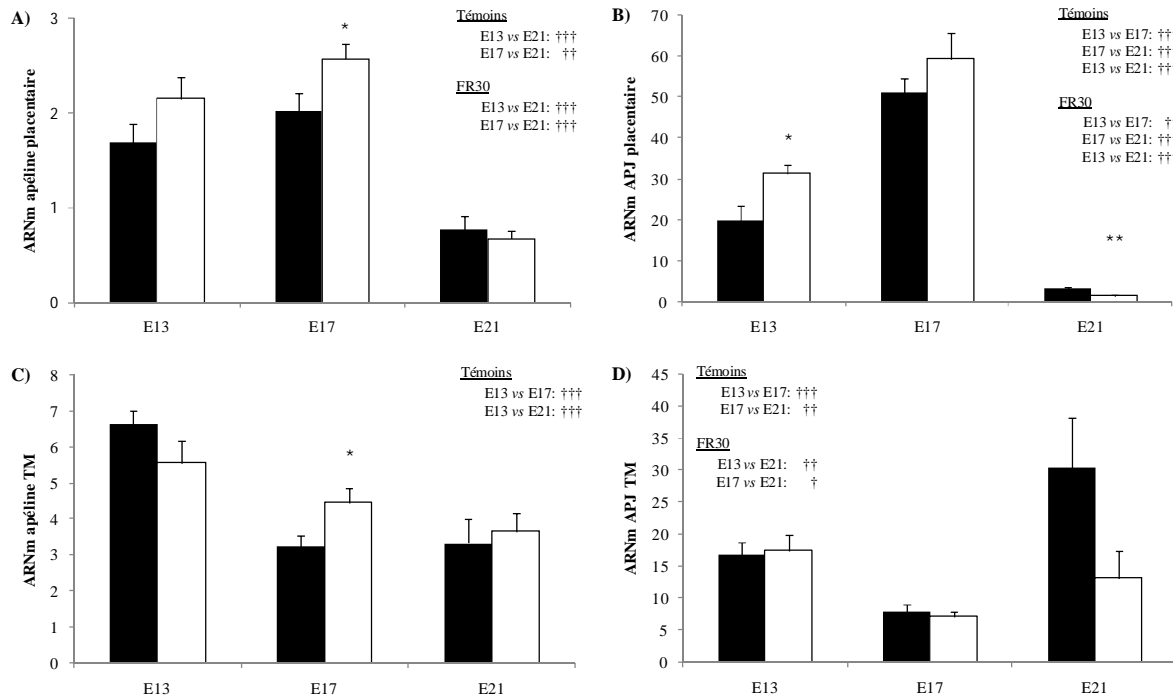


Figure 24 : Impact de la dénutrition maternelle sur l'expression de l'apéline (A-C) et du récepteur APJ (B-D) dans le placenta (A-B) et le triangle mésométrial (C-D) durant la gestation. Les animaux témoins sont représentés en noir et le groupe FR30 en blanc. TM : triangle mésométrial. Les expressions mesurées sont rapportées à l'expression des gènes rapporteurs dans chaque condition et sont donc exprimées en unité arbitraire. Ces données représentent la moyenne \pm SEM. † $P < 0,05$; †† $P < 0,01$; ††† $P < 0,001$; suivant l'âge gestationnel. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; FR30 versus témoins. (Test t , variables vérifiant la loi normale).

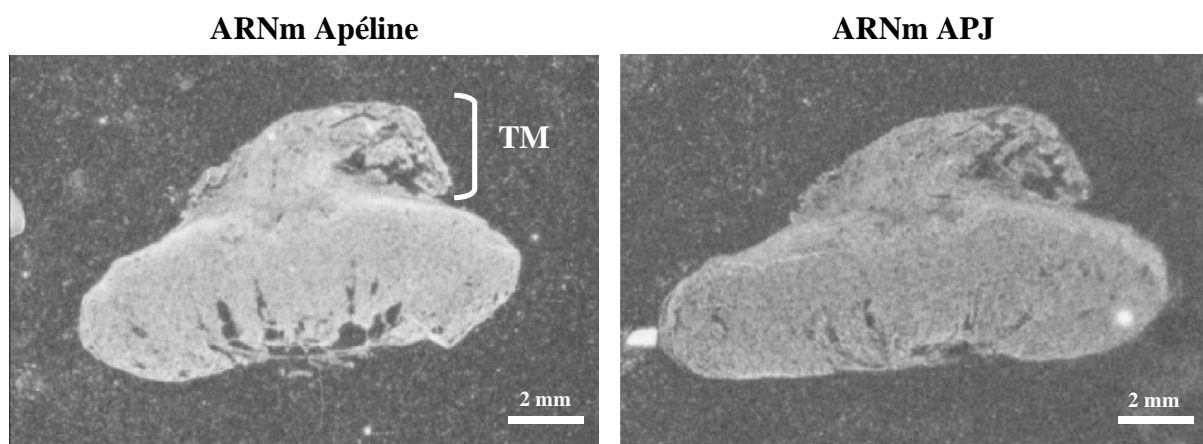


Figure 25 : Localisation de l'expression placentaire de l'apéline et de son récepteur par hybridation *in situ*. TM : triangle mésométrial.

c) *L'expression placentaire du système apélinergique est-elle modulée chez l'Homme dans des pathologies associées à des croissances fœtales altérées ?*

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des échantillons extraits de villosités placentaires humaines. Cette partie du placenta est le lieu des échanges fœto-maternels et correspond chez le rat à la zone labyrinthique. Les paramètres maternels et fœtaux provenant de ces placentas ayant pour la plupart déjà été commentés dans l'étude BDNF, vont être brièvement décrits dans cette section (Tableau 9). Nous avons pu constituer trois groupes de naissances présentant un RCIU dont les origines sont différentes : un groupe RCIU dont l'étiologie est inconnue, un groupe RCIUV présentant une résistance vasculaire anormale au niveau de l'artère utérine et un groupe PER provenant de grossesse pré-éclampsique. Ces enfants présentent un fort taux de RCIU (-57 % ; - 56 % ; -56 % du poids de naissance respectivement pour les groupes RCIU, RCIUV et PER). De même, la taille de ces nouveau-nés ainsi que leurs périmètres crâniens sont diminués dans chacun de ces groupes. Ces grossesses étant pathologiques, l'âge gestationnel est également diminué. Nous avons également pu recueillir des échantillons placentaires provenant d'enfants macrosomes (M) et de mères diabétiques de type 1 (D), puisque cette pathologie est fortement associée à la naissance d'enfants macrosomes (Castorino et Jovanović, 2011). Ces macrosomes présentent un poids de naissance augmenté de 30 % pour le groupe T + M et 11 % pour le groupe D + M sans que l'âge gestationnel ne soit modifié.

Par qRT-PCR, nous avons mesuré l'expression placentaire du système apélinergique dans ces grossesses atypiques (Figure 26). Nous avons observé que l'expression génique de l'apéline est diminuée de moitié dans les trois groupes de RCIU ainsi que dans les grossesses diabétiques. Bien que diminuée, l'expression de l'apéline dans le groupe T+M n'est pas significativement modulée, ceci pourrait s'expliquer par le nombre faible d'échantillons placentaires (n = 5). De manière étonnante, l'expression du récepteur APJ n'est pas fortement affectée par ces modulations de la croissance fœtale. Seule une diminution de son expression a été observée dans le groupe RCIU d'origine vasculaire.

Tableau 9 : Paramètres maternels et fœtaux

A	T	RCIU	RCIUV	PER
Âge gestationnel (semaines)	38,6 ± 0,3	34,2 ± 0,6 ^a	34,1 ± 1,1 ^b	32,6 ± 0,6 ^c
Âge maternel (années)	34,1 ± 2,0	30,6 ± 2,9	30,4 ± 1,9	32,3 ± 1,7
Taille (cm)	49,2 ± 0,6	42,9 ± 0,7 ^d	41,9 ± 1,2 ^e	40,1 ± 1,9 ^f
Poids de naissance (g)	3530 ± 224	1518 ± 173 ^d	1562 ± 231 ^e	1644 ± 172 ^c
Périmètre crânien (cm)	36,1 ± 0,6	30,9 ± 0,7 ^d	30,6 ± 0,9 ^e	29,9 ± 1,3 ^f

Ces données représentent la moyenne ± SEM (n = 7 - 17 mères ou nouveau-nés). ^a, P < 0,01, RCIU *versus* Témoins ; ^b, P < 0,01, RCIUV *versus* Témoins ; ^c, P < 0,001, PER *versus* Témoins ; ^d, P < 0,001, RCIU *versus* Témoins ; ^e, P < 0,001, RCIUV *versus* Témoins ; ^f, P < 0,01, PER *versus* Témoins.

B	T	T + M	D	D + M
Âge gestationnel (semaines)	38,6 ± 0,3	39,6 ± 0,5	38,1 ± 0,3 ^h	37,1 ± 0,6
IMC avant la grossesse (kg.m ⁻²)	23,5 ± 2,5	24,3 ± 1,0	22,2 ± 0,4	25,2 ± 2,2
Poids de naissance (g)	3198 ± 106	4526 ± 191 ^g	3356 ± 125 ⁱ	3768 ± 261 ^j
Poids placentaire (g)	372 ± 36	575 ± 23 ^g	474 ± 29 ^h	489 ± 50 ^j

Ces données représentent la moyenne ± SEM (n= 5 mères nouveau-nés). ^g, P < 0,001, M *versus* Témoins ; ^h, P < 0,05, D *versus* T + M ; ⁱ, P < 0,001, D *versus* T + M ; ^j, P < 0,05, D + M *versus* D.

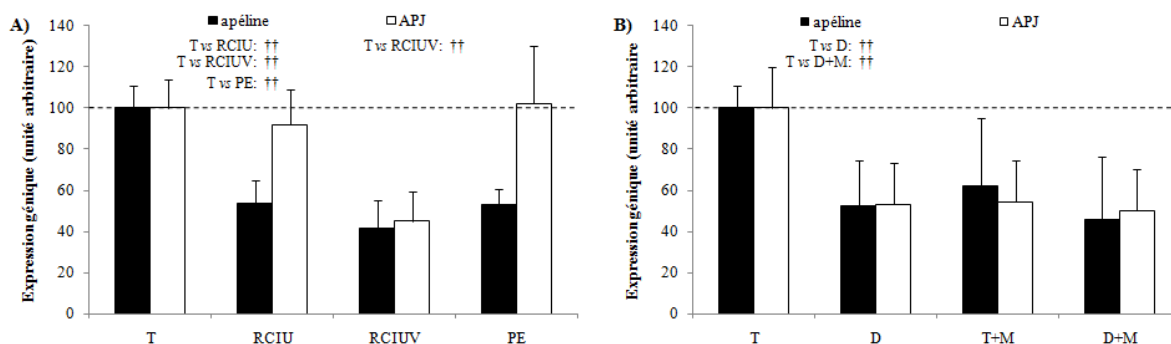


Figure 26 : Étude de l'expression placentaire d'apéline et de son récepteur APJ par qRT-PCR chez l'Homme dans le cadre de pathologies associées à un RCIU (A) ou à une macrosomie (B). T : témoins ; RCIUV : RCIU vasculaire ; PE : pré-éclampsie ; PER : pré-éclampsie + RCIU ; D : diabète de type 1 ; M : macrosomie. Les expressions mesurées sont rapportées à l'expression des gènes rapporteurs dans chaque condition et sont donc exprimées en unité arbitraire. Ces données représentent la moyenne ± SEM. † P < 0,05 ; †† P < 0,01. (Test t, variables vérifiant la loi normale).

IV. Discussion

a) Quel est le rôle du système apéline/APJ dans la gestation et la croissance fœtale ?

La gestation est caractérisée par de nombreux changements physiologiques au niveau du système cardiovasculaire, de l'homéostasie hydrominérale et du métabolisme énergétique. À ce jour, il n'existe que très peu d'études s'intéressant au couple apéline/APJ durant la gestation. Cependant, l'apéline pourrait avoir un rôle important dans ces modifications physiologiques. En accord avec les actions de l'apéline décrites dans la littérature, il est possible que l'apéline participe à la croissance fœtale par la régulation de la pression sanguine, de l'angiogenèse et du métabolisme glucidique et lipidique. Une étude a montré que l'ARNm de l'apéline est augmenté de façon transitoire au début de la gestation chez le rat dans le tissu adipeux blanc et brun. La raison de cette augmentation reste inconnue, mais il est possible qu'elle soit liée à l'accumulation de tissu adipeux qui est observé durant cette période (Josephs *et al.*, 2007). Chez l'Homme, une très forte expression du système apélinergique a été retrouvée au niveau du placenta comparativement au tissu adipeux (Telejko *et al.*, 2010). Chez le rat, le couple apéline/APJ semble également être fortement exprimé à la fois par le placenta et par le triangle mésométrial. L'apéline, produite à ce niveau, pourrait avoir un rôle local puisque nous n'avons pas observé d'augmentation durant la gestation du taux d'apéline circulant chez le rat. Chez l'Homme, une légère diminution du taux circulant d'apéline a été montrée entre des femmes enceintes et non enceintes (Kourtis *et al.*, 2011). Une autre étude a montré que les taux d'apéline sont plus élevés à terme dans le sang de cordon ombilical que dans le sang maternel (Malamitsi-Puchner *et al.*, 2007). Bien que cette étude ait pu mettre en évidence une corrélation positive entre les taux circulants d'apéline maternelle et fœtale, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre ces taux et le poids de naissance. Cette étude semble confirmer l'importance du placenta dans la production de l'apéline fœtale puisque les taux d'apéline du nouveau-né diminuent après l'accouchement. Dans notre étude, nous avons pu examiner la localisation de l'expression placentaire du système apélinergique par hybridation *in situ*. Nous avons ainsi pu observer que cette expression semble exprimée dans l'ensemble du placenta avec une intensité légèrement plus forte au niveau du trophospongium et de la decidua. Les analyses par qRT-PCR ont également souligné l'importance de l'utérus et plus particulièrement du site d'implantation placentaire dans la synthèse d'apéline chez le rat.

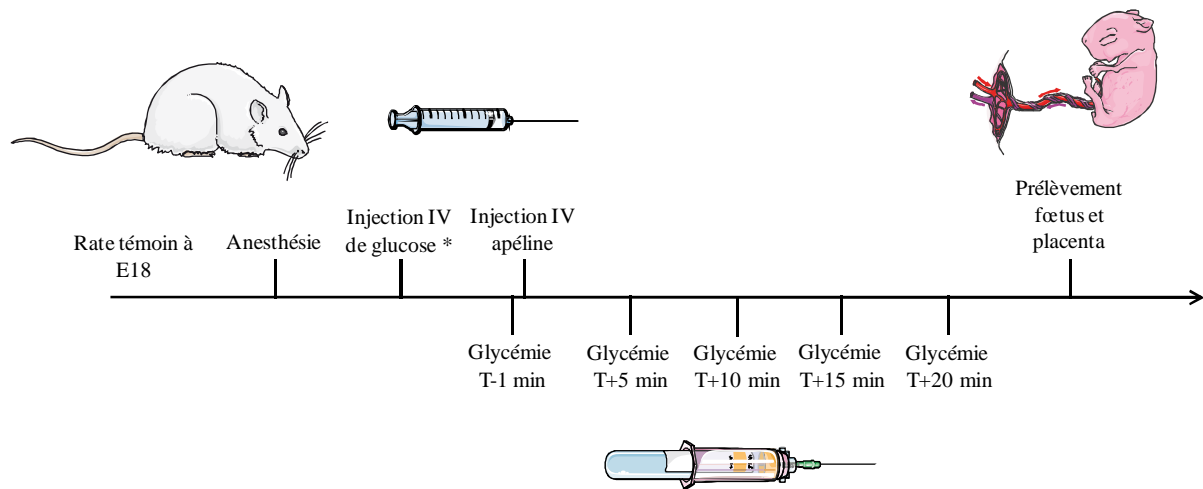


Figure 27 : Représentation schématique d'une expérience permettant d'étudier l'impact de l'apéline sur le transfert transplacentaire de glucose. Des rates gestantes depuis 17 jours et à jeun sont anesthésiées par de l'isoflurane. La veine jugulaire est isolée afin d'injecter une solution de 2-déoxyglucose radioactif, ce qui permettra de voir le passage transplacentaire de glucose. Afin d'avoir la glycémie basale, une mesure est effectuée à t-1min par prélèvement par la queue. Une quantité à déterminer d'apéline est ensuite injectée, puis des mesures de la glycémie maternelle seront effectuées toutes les 5 minutes. Après la mesure à t+20min, les fœtus ainsi que leurs placentas seront prélevés séparément puis analysés par un compteur de radioactivité afin de vérifier le passage transplacentaire de glucose marqué. Des animaux témoins auxquels l'injection d'apéline sera remplacée par une injection d'eau physiologique, seront réalisés en même temps.

L'ontogenèse de l'expression de l'ARNm du système apélinergique chez la rat a mis en évidence une chute importante dans le placenta et le triangle mésométrial à l'approche du terme de la gestation. Cette chute coïncide avec la baisse des taux circulants d'apéline chez les fœtus. Ce phénomène n'a encore jamais été observé et suggère un rôle potentiel de cette chute d'apélinémie dans le processus de parturition. Bien qu'il soit difficile de transposer ces résultats à l'Homme, ce phénomène remet en cause l'interprétation de l'absence de corrélation entre les taux d'apéline maternelle et fœtale puisque ceux-ci n'ont été mesurés qu'à terme. Ainsi, nous ne pouvons exclure totalement un rôle plus ou moins direct de l'apéline sur la croissance fœtale.

En accord avec les résultats de Dray et collaborateurs, nous émettons également l'hypothèse que l'expression d'apéline maternelle pourrait diminuer la glycémie maternelle en favorisant la captation du glucose par le muscle et le tissu adipeux (Dray *et al.*, 2008), mais également en augmentant le passage transplacentaire du glucose vers le fœtus. Ce transport du glucose pourrait se faire par la production de NO par le placenta, ce qui induirait une vasodilatation au niveau de l'artère utérine, favorisant ainsi un passage transplacentaire accru de glucose et de nutriments. Il est également possible que l'activation du récepteur APJ dans le placenta puisse augmenter l'expression des transporteurs au glucose tels que les GLUT 1 et 3 par exemple. Afin de vérifier cette hypothèse, une étude sera prochainement menée au laboratoire sur des femelles témoins gestantes de 17 jours, période qui correspond à une croissance fœtale maximale et dont les expressions d'apéline/APJ sont élevées au niveau du placenta (Figure 27).

Puisque l'apéline a une demi-vie courte dans le sang liée notamment à son inactivation par l'ACE2 (Vickers *et al.*, 2002), l'utilisation d'un agoniste pharmacologique non peptidique du récepteur APJ [le composé E339-3D6 (Iturrioz *et al.*, 2010)] pourrait également permettre de vérifier l'impact de l'apéline sur la croissance fœtale. Cette expérience consisterait en des injections chroniques de cet agoniste durant la dernière semaine de gestation chez le rat. Une mesure simple du poids de naissance de ces animaux à terme permettrait ainsi de conclure quant à l'impact de l'apéline sur la croissance placentaire et fœtale. De même, des mesures similaires chez des animaux déficients en apéline pourraient conforter ou non cette hypothèse.

Perspectives d'effets programmeurs sur le long terme

De nombreuses données ont mis en évidence que la période embryonnaire est critique pour un développement adéquat de la descendance, et qu'un environnement délétère durant cette période critique peut conduire à de lourdes conséquences physiologiques et métaboliques à l'âge adulte. À ce jour, les principaux mécanismes connus pour contribuer à cette programmation et permettant d'expliquer cette programmation fœtale des pathologies de l'adulte sont la surexposition *in utero* aux glucocorticoïdes et les modulations épigénétiques. À travers les différentes études menées durant cette thèse, nous avons pu mettre en évidence des nouvelles voies pouvant contribuer à la croissance fœtale. C'est pourquoi, je vais dans cette partie, discuter de leur implication potentielle dans les mécanismes de programmation fœtale.

a) Impacts des mitochondries dans la programmation fœtale ?

Dans un premier temps, nous avons montré que la dénutrition maternelle aboutissant à un RCIU, conduit les mitochondries placentaires à une certaine plasticité, qui va leur permettre d'optimiser l'efficacité de la production d'énergie par la chaîne respiratoire. Ce mécanisme va, à court terme, permettre de répondre aux besoins énergétiques nécessaires à la gestation. Cependant, les réserves énergétiques s'épuisent rapidement, ce qui diminuera la quantité de substrats disponibles pour la chaîne respiratoire et aboutira à une diminution de la production d'ATP placentaire. Comme nous l'avons vu précédemment, dans les études épidémiologiques concernant la famine d'Amsterdam, l'impact de la dénutrition sur la programmation du syndrome métabolique est d'autant plus important que cette exposition a lieu au début de la gestation. Des études ont montré que dans un modèle de RCIU induit par ligature des artères utérines, on observe une augmentation de l'efficacité de la chaîne respiratoire dans le foie et dans le muscle du fœtus, mais cette adaptation conduit à des dysfonctions mitochondriales aboutissant à une baisse de la production d'ATP chez l'individu à 28 jours de vie (Peterside *et al.*, 2003 ; Selak *et al.*, 2003). Il a ainsi été proposé que ce mécanisme va permettre au fœtus de survivre dans un environnement où l'apport en énergie est limité. Cependant, par un mécanisme encore mal compris à ce jour, cela aboutira à des dysfonctionnements des mitochondries qui vont participer à la programmation des pathologies métaboliques chez l'individu à l'âge adulte (Reusens *et al.*, 2011).

Des études ont montré un stress oxydatif plus important dans le sérum de femmes enceintes présentant un RCIU (Karowicz-Bilinska *et al.*, 2007). Ainsi, les ROS produites en partie par les mitochondries placentaires, vont être libérées dans la circulation sanguine fœtale et vont conduire à des dommages *in utero* au niveau des lipides, des protéines mais aussi de l'ADNmt, engendrant des dysfonctions au niveau des mitochondries du fœtus, qui en retour, vont amplifier ce phénomène en générant une production de ROS plus importante (Leduc *et al.*, 2010). Les dommages ainsi obtenus seraient, en partie, responsables du développement de pathologies comme l'athérosclérose. Bien que nos données à ce niveau ne soient que préliminaires, il semblerait que les placentas du groupe FR30 présentent une production de ROS moins importante, ce qui pourrait exclure cette hypothèse dans les mécanismes de la programmation fœtale.

Il se peut également que l'action des mitochondries dans la programmation fœtale passe par l'action des glucocorticoïdes. En effet, des analyses ont permis de révéler la présence du récepteur GR dans les mitochondries ainsi que la présence dans son génome, de séquences nucléotidiques présentant une forte homologie avec les éléments de réponse aux glucocorticoïdes (Ioannou *et al.*, 1988 ; Psarra et Sekeris, 2009). Ces résultats suggèrent donc un rôle de ces hormones dans la transcription du génome mitochondrial et donc potentiellement dans la régulation de la transcription de certains gènes de la chaîne respiratoire. Une hypercorticostéronémie basale ayant été retrouvée chez les animaux issus de mères dénutries, on peut supposer que cette hormone participe, en partie à la programmation des pathologies chez l'adulte (Breton *et al.*, 2009).

Enfin, on peut émettre l'hypothèse que le nombre et le fonctionnement des mitochondries chez l'adulte exposé, *in utero*, à une dénutrition puissent être affectés à long terme. En effet, comme nous l'avons démontré au laboratoire pour l'axe corticotrope, des altérations observées durant la période périnatale suite à la dénutrition maternelle, peuvent encore être présentes à l'âge adulte. On peut donc envisager que les altérations mitochondriales, que nous avons montrées dans notre travail, pourraient se retrouver dans certains tissus chez la descendance à l'âge adulte. En accord avec cette hypothèse, les travaux de Theys et ses collaborateurs ont démontré chez le rat que les restrictions caloriques ou protéiques, ou encore un régime hyperlipidique durant la période fœtale, sont capables d'induire à long terme des dysfonctions mitochondriales dans les cellules β -pancréatiques, et sont en partie responsables d'altérations de la sécrétion d'insuline (Theys *et al.*, 2009a ; Theys

et al., 2011). La programmation périnatale des mitochondries commence donc à être envisagée par quelques auteurs, comme un possible vecteur du développement des maladies métaboliques chez l'adulte. Des études complémentaires seront à mener pour démontrer la réalité de ce phénomène, notamment chez l'Homme.

b) BDNF/TrkB et le concept de programmation fœtale

De par son rôle prépondérant durant la gestation, le BDNF a un rôle important dans la croissance fœtale et semble donc être une cible privilégiée de la programmation des pathologies selon l'hypothèse de Barker. Comme il n'existe qu'une étude de programmation fœtale ayant montré des variations d'expression du BDNF dans les tissus périphériques et plus particulièrement au niveau du tissu adipeux chez le rat adulte exposé au RCIU (Lukaszewski *et al.*, 2011), je me focaliserai dans cette discussion sur les tissus centraux. La programmation métabolique de l'adulte semble en partie liée à des perturbations du développement cérébral. Les mécanismes intervenant dans la mise en place du RCIU vont avoir des répercussions sur le développement du cerveau du fœtus et du nouveau-né et pourraient programmer des conséquences à plus long terme sur l'activité nerveuse et les capacités intellectuelles de l'individu à l'âge adulte. Le RCIU est ainsi connu pour engendrer, chez le jeune enfant, des déficits intellectuels (Broekman *et al.*, 2009) ainsi que des retards cognitifs (de Bie *et al.*, 2010). On peut supposer que ces diminutions de capacités intellectuelles et cognitives soient en partie liées à des perturbations précoces de l'action des neurotrophines et notamment du système BDNF/TrkB, ce qui pourrait entraîner des modifications structurelles et fonctionnelles cérébrales. Certains auteurs, comme Gilmore et ses collaborateurs, ont émis l'hypothèse que des modulations *in utero* du BDNF pourraient également être responsables de la programmation de lourdes pathologies neurodéveloppementales telles que la schizophrénie (Gilmore *et al.*, 2003). Ces auteurs ont montré qu'une injection intra-péritonéale de lipopolysaccharides à E16 chez la rate gestante, mimant ainsi une infection bactérienne, diminue très rapidement les taux plasmatiques de BDNF et augmente ceux du cerveau fœtal, ce qui pourrait modifier fortement la neurogenèse et la maturation des tissus nerveux. À l'inverse, l'exercice physique chez la rate gestante augmente l'expression du BDNF et la neurogenèse dans l'hippocampe ainsi que la mémoire à court terme un mois après la naissance (Lee *et al.*, 2006).

Les modèles de programmation fœtale, par dénutrition ou malnutrition, semblent également avoir une empreinte sur le développement cérébral. Une étude a montré qu'un régime ne contenant que 6 % de protéines durant la gestation réduit l'expression hippocampique de BDNF de la progéniture au 4^{ème} jour postnatal et diminue leur faculté de mémorisation, et ce, de manière d'autant plus marquée, si ce régime a lieu tôt durant la gestation (Wang et Xu, 2007). Il a également été montré au laboratoire qu'une dénutrition de 50 % de la ration alimentaire, durant la dernière semaine de gestation jusqu'au sevrage, induit des modulations de l'expression du BDNF dans l'hypothalamus et l'hippocampe associées à des perturbations de la prolifération cellulaire cérébrale dans ces zones (Coupé *et al.*, 2009). Ces résultats démontrent que la dénutrition périnatale module à la fois l'expression de la neurotrophine BDNF et la prolifération cellulaire cérébrale, et ce, durant des fenêtres temporelles critiques du développement. Cependant, suivant le tissu (placenta ou SNC) et le stade étudié (prénatal ou postnatal), la dénutrition peut avoir des actions moléculaires et cellulaires opposées, potentiellement à l'origine de dysfonctions physiologiques ultérieures. Enfin, il a récemment été montré chez l'Homme que le lait maternel contient du BDNF. Des perturbations de sécrétion de cette neurotrophine, par la glande mammaire durant la période postnatale, pourraient également intervenir dans la programmation métabolique de la descendance (Li *et al.*, 2011a).

c) Quid du système apélinergique ?

Nos études ont permis de démontrer que le système apélinergique placentaire ainsi que les taux circulants de cette hormone chez la mère et son fœtus sont modulés par la sous-nutrition maternelle et le RCIU. À ce jour, on ne connaît pas la fonction physiologique précise de ce système durant la grossesse. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'au niveau placentaire, il pourrait participer à la fois à la mise en place du placenta (vascularisation, développement cellulaire) mais aussi à son activité (contrôle de l'irrigation sanguine, transfert de nutriments). Il est probable que ce système exerce aussi des fonctions particulières chez le fœtus. En guise d'exemple, nous avons réalisé un marquage par immunohistochimie de l'apéline chez des fœtus de rat à E18. Une immunoréactivité importante a été retrouvée dans de nombreux organes tels que l'intestin, l'estomac, la glande surrénale, le foie, le cœur et les poumons. Il est donc probable qu'au sein de ces organes, l'apéline exerce des fonctions physiologiques en lien avec le développement et la maturation de ces tissus, et que la

sous-nutrition maternelle puisse perturber à court et à long terme ceux-ci. En accord avec cette dernière hypothèse, nous avons observé des taux circulants d'apéline plus élevés chez les animaux FR30 à l'âge de 4 mois (donnée non publiée). Ce résultat semble démontrer une programmation à long terme du système apélinergique par la dénutrition maternelle et le RCIU. Des expériences complémentaires vont être menées dans certains tissus (hypothalamus, tissu adipeux) afin de déterminer si cette altération est retrouvée à leur niveau. De manière analogue, nous avons démontré au laboratoire dans deux modèles de restriction calorique, une altération de l'expression d'une autre adipocytokine : la leptine, durant la période périnatale et qui se prolonge jusqu'à l'âge adulte, avec notamment des modulations marquées au niveau du tissu adipeux chez les rats adultes (Delahaye *et al.*, 2008 ; Lukaszewski *et al.*, 2011). Les adipocytokines semblent donc représenter des systèmes physiologiques vulnérables à la programmation fœtale et potentiellement impliquées dans les pathologies métaboliques de l'adulte.

Conclusion

En utilisant un modèle expérimental de dénutrition maternelle produisant un important RCIU chez le rat, nous avons pu mettre en évidence de nouvelles d'altérations mettant en jeu des facteurs jusqu'alors peu connus au niveau du placenta. Ainsi, le placenta est capable d'assurer une certaine plasticité mitochondriale fonctionnelle lors d'un environnement nutritionnel délétère *via* une biogenèse mitochondriale et une modulation de l'activité de la chaîne respiratoire. Cet organe produit également des neurotrophines, comme le BDNF, qui pourraient exercer des actions au sein du placenta mais aussi être transférées vers le fœtus, assurant ainsi un contrôle de la neurogenèse et de la maturation du tissu nerveux durant la vie fœtale. L'hormone apéline, encore très peu étudiée au cours du développement, semble également être un bon candidat dans le contrôle du développement fœtal mais aussi dans la programmation métabolique et endocrine à long terme. Enfin, bien que non présenté ici, nous avons également démontré que le facteur épigénétique FTO est aussi altéré au niveau placentaire par des manipulations nutritionnelles chez le rongeur et par des altérations de la croissance fœtale chez l'Homme (article soumis). Notre modèle FR30 représente donc un modèle d'intérêt pour identifier de nouvelles voies responsables de mécanismes physiopathologiques en lien avec la programmation prénatale du syndrome métabolique. L'évaluation ultérieure de leur implication, en situation clinique, pourrait peut être permettre la mise en place de nouveaux outils de diagnostic ou thérapeutiques.

Références

- A -

- Abrams, B., Altman, S. L., et Pickett, K. E. (2000). Pregnancy weight gain: still controversial. *Am. J. Clin. Nutr* 71, 1233S-41S.
- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., et Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res* 85, 525-535.
- Anderson, G. D., Blidner, I. N., McClemon, S., et Sinclair, J. C. (1984). Determinants of size at birth in a Canadian population. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 150, 236-244.
- Andley, U. P. (2009). Effects of alpha-crystallin on lens cell function and cataract pathology. *Curr. Mol. Med.* 9, 887-892.
- Anin, S. A., Vince, G., et Quenby, S. (2004). Trophoblast invasion. *Hum Fertil (Camb)* 7, 169-174.
- Arima, T., Hata, K., Tanaka, S., Kusumi, M., Li, E., Kato, K., Shiota, K., Sasaki, H., et Wake, N. (2006). Loss of the maternal imprint in *Dnmt3L*mat^{-/-} mice leads to a differentiation defect in the extraembryonic tissue. *Developmental Biology* 297, 361-373.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., *et al.* (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 257, 79-83.
- Armanini, M. P., McMahon, S. B., Sutherland, J., Shelton, D. L., et Phillips, H. S. (1995). Truncated and catalytic isoforms of *trkB* are co-expressed in neurons of rat and mouse CNS. *Eur. J. Neurosci* 7, 1403-1409.
- Arroyo, J. A., et Winn, V. D. (2008). Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta. *Semin. Perinatol.* 32, 172-177.
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M. C., Gubern, M., Surwit, R., *et al.* (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26, 435-439.
- Attané, C., Daviaud, D., Dray, C., Dusaulcy, R., Masseboeuf, M., Prévot, D., Carpéné, C., Castan-Laurell, I., et Valet, P. (2011). Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue *ex vivo*. *J. Mol. Endocrinol* 46, 21-28.
- Azizi, M., Iturrioz, X., Blanchard, A., Peyrard, S., De Mota, N., Chartrel, N., Vaudry, H., Corvol, P., et Llorens-Cortes, C. (2008). Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J. Am. Soc. Nephrol* 19, 1015-1024.

- B -

- Baisden, B., Sonne, S., Joshi, R. M., Ganapathy, V., et Shekhawat, P. S. (2007). Antenatal dexamethasone treatment leads to changes in gene expression in a murine late placenta. *Placenta* 28, 1082-1090.
- Barde, Y. A., Edgar, D., et Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1, 549-553.
- Barker, D. J., Bull, A. R., Osmond, C., et Simmonds, S. J. (1990). Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 301, 259-262.
- Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., et Wadsworth, M. E. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298, 564-567.
- Bartha, J. L., Comino-Delgado, R., Martinez-Del-Fresno, P., Fernandez-Barrios, M., Bethencourt, I., et Moreno-Corral, L. (2000). Insulin-sensitivity index and carbohydrate and lipid metabolism in gestational diabetes. *J Reprod Med* 45, 185-189.
- Battaglia, F. C., et Lubchenco, L. O. (1967). A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J. Pediatr.* 71, 159-163.
- Baxter, G. T., Radeke, M. J., Kuo, R. C., Makrides, V., Hinkle, B., Hoang, R., Medina-Selby, A., Coit, D., Valenzuela, P., et Feinstein, S. C. (1997). Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. *J. Neurosci* 17, 2683-2690.
- Beattie, M. S., Harrington, A. W., Lee, R., Kim, J. Y., Boyce, S. L., Longo, F. M., Bresnahan, J. C., Hempstead, B. L., et Yoon, S. O. (2002). ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 36, 375-386.
- Belda, X., Ons, S., Carrasco, J., et Armario, A. (2005). The effects of chronic food restriction on hypothalamic-pituitary-adrenal activity depend on morning versus evening availability of food. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 41-46.
- Belizán, J. M., Villar, J., Nardin, J. C., Malamud, J., et De Vicurna, L. S. (1978). Diagnosis of intrauterine growth retardation by a simple clinical method: measurement of uterine height. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 131, 643-646.
- Belkacemi, L., Chen, C. H., Ross, M. G., et Desai, M. (2009). Increased placental apoptosis in maternal food restricted gestations: role of the Fas pathway. *Placenta* 30, 739-751.
- Belkacemi, L., Desai, M., Nelson, D. M., et Ross, M. G. (2011). Altered mitochondrial apoptotic pathway in placentas from undernourished rat gestations. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918224> [Consulté septembre 20, 2011].
- Belkacemi, L., Nelson, D. M., Desai, M., et Ross, M. G. (2010). Maternal undernutrition influences placental-fetal development. *Biol. Reprod* 83, 325-331.
- Beltowski, J. (2006). Apelin and visfatin: unique « beneficial » adipokines upregulated in obesity? *Med. Sci. Monit* 12, RA112-119.

- Benaitreau, D., Dieudonné, M.-N., Dos Santos, E., Leneveu, M.-C., Mazancourt, P. de, et Pecquery, R. (2009). Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. *Biol. Reprod* 80, 1107-1114.
- Benediktsson, R., Calder, A. A., Edwards, C. R., et Seckl, J. R. (1997). Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 46, 161-166.
- Bevilacqua, L., Ramsey, J. J., Hagopian, K., Weindruch, R., et Harper, M.-E. (2004). Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E852-861.
- Bhattacharjee, J., Ietta, F., Giacomello, E., Bechi, N., Romagnoli, R., Fava, A., et Paulesu, L. (2010). Expression and localization of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) in first trimester and term human placenta. *Placenta* 31, 423-430.
- Bhattacharya, S., Campbell, D. M., Liston, W. A., et Bhattacharya, S. (2007). Effect of Body Mass Index on pregnancy outcomes in nulliparous women delivering singleton babies. *BMC Public Health* 7, 168.
- de Bie, H. M. A., Oostrom, K. J., et Delemarre-van de Waal, H. A. (2010). Brain development, intelligence and cognitive outcome in children born small for gestational age. *Horm Res Paediatr* 73, 6-14.
- Biffo, S., Offenhäuser, N., Carter, B. D., et Barde, Y. A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121, 2461-2470.
- Blondeau, B., Lesage, J., Czernichow, P., Dupouy, J. P., et Bréant, B. (2001). Glucocorticoids impair fetal beta-cell development in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E592-599.
- Bloom, S. L., Sheffield, J. S., McIntire, D. D., et Leveno, K. J. (2001). Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstet Gynecol* 97, 485-490.
- Bloomfield, F. H., van Zijl, P. L., Bauer, M. K., et Harding, J. E. (2002). A chronic low dose infusion of insulin-like growth factor I alters placental function but does not affect fetal growth. *Reprod. Fertil. Dev* 14, 393-400.
- Boesmans, W., Gomes, P., Janssens, J., Tack, J., et Vanden Berghe, P. (2008). Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system. *Gut* 57, 314-322.
- Bol, V., Desjardins, F., Reusens, B., Balligand, J.-L., et Remacle, C. (2010). Does Early Mismatched Nutrition Predispose to Hypertension and Atherosclerosis, in Male Mice? *PLoS ONE* 5, e12656.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., et Giacobino, J. P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 408, 39-42.
- Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gestá, S., Guigné, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpené, C., et al. (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146, 1764-1771.

- Brand, M. D., Chien, L. F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F., et Porter, R. K. (1994). The causes and functions of mitochondrial proton leak. *Biochim. Biophys. Acta* *1187*, 132-139.
- Breton, C., Lukaszewski, M.-A., Risold, P.-Y., Enache, M., Guillemot, J., Rivière, G., Delahaye, F., Lesage, J., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., *et al.* (2009). Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* *296*, E462-472.
- Broekman, B. F. P., Chan, Y.-H., Chong, Y.-S., Quek, S.-C., Fung, D., Low, Y.-L., Ooi, Y.-P., Gluckman, P. D., Meaney, M. J., Wong, T.-Y., *et al.* (2009). The influence of birth size on intelligence in healthy children. *Pediatrics* *123*, e1011-1016.
- Brooks, A. A., Johnson, M. R., Steer, P. J., Pawson, M. E., et Abdalla, H. I. (1995). Birth weight: nature or nurture? *Early Hum. Dev* *42*, 29-35.
- Buchanan, T. (1995). Metabolic changes during normal and diabetic pregnancy. Dans *Diabetes Mellitus in Pregnancy* (New York: Coustan DR), p. 59-77.

- C -

- Caminos, J. E., Nogueiras, R., Gallego, R., Bravo, S., Tovar, S., García-Caballero, T., Casanueva, F. F., et Diéguez, C. (2005). Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *90*, 4276-4286.
- Castan-Laurell, I., Vítková, M., Daviaud, D., Dray, C., Kováčiková, M., Kovacova, Z., Hejnova, J., Stich, V., et Valet, P. (2008). Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur. J. Endocrinol* *158*, 905-910.
- Castorino, K., et Jovanovič, L. (2011). Pregnancy and diabetes management: advances and controversies. *Clin. Chem* *57*, 221-230.
- Cattanach, B. M., et Kirk, M. (1985). Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* *315*, 496-498.
- Cayabyab, M., Hinuma, S., Farzan, M., Choe, H., Fukusumi, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Hosoya, M., Nishimura, O., Messele, T., *et al.* (2000). Apelin, the natural ligand of the orphan seven-transmembrane receptor APJ, inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry. *J. Virol* *74*, 11972-11976.
- Chang, G.-Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., et Leibowitz, S. F. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J. Neurosci.* *28*, 12107-12119.
- Chataway, T. K., Whittle, A. M., Lewis, M. D., Bindloss, C. A., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Hopwood, J. J., et Meikle, P. J. (1998). Development of a two-dimensional gel electrophoresis database of human lysosomal proteins. *Electrophoresis* *19*, 834-836.

- Chen, C.-P., Bajoria, R., et Aplin, J. D. (2002). Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intrauterine growth-restricted fetuses with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *187*, 764-769.
- Chien, E. K., Hara, M., Rouard, M., Yano, H., Phillippe, M., Polonsky, K. S., et Bell, G. I. (1997). Increase in serum leptin and uterine leptin receptor messenger RNA levels during pregnancy in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *237*, 476-480.
- Choe, H., Farzan, M., Konkel, M., Martin, K., Sun, Y., Marcon, L., Cayabyab, M., Berman, M., Dorf, M. E., Gerard, N., *et al.* (1998). The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* *72*, 6113-6118.
- Choe, W., Albright, A., Sulcove, J., Jaffer, S., Hesselgesser, J., Lavi, E., Crino, P., et Kolson, D. L. (2000). Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J. Neurovirol* *6 Suppl 1*, S61-69.
- Chouthai, N. S., Sampers, J., Desai, N., et Smith, G. M. (2003). Changes in neurotrophin levels in umbilical cord blood from infants with different gestational ages and clinical conditions. *Pediatr. Res* *53*, 965-969.
- Chuang, H.-C., Chang, C.-W., Chang, G.-D., Yao, T.-P., et Chen, H. (2006). Histone deacetylase 3 binds to and regulates the GCMa transcription factor. *Nucleic Acids Res* *34*, 1459-1469.
- Civitarese, A. E., Carling, S., Heilbronn, L. K., Hulver, M. H., Ukropcova, B., Deutsch, W. A., Smith, S. R., et Ravussin, E. (2007). Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.* *4*, e76.
- Clark, P. M., Hindmarsh, P. C., Shiell, A. W., Law, C. M., Honour, J. W., et Barker, D. J. (1996). Size at birth and adrenocortical function in childhood. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* *45*, 721-726.
- Cogswell, M. E., et Yip, R. (1995). The influence of fetal and maternal factors on the distribution of birthweight. *Semin. Perinatol* *19*, 222-240.
- Coll, A. P., Farooqi, I. S., et O'Rahilly, S. (2007). The hormonal control of food intake. *Cell* *129*, 251-262.
- Cottrell, E. C., et Seckl, J. R. (2009). Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci* *3*, 19.
- Coupé, B., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Lefèvre, F., Mairesse, J., Dickes-Coopman, A., Silhol, M., Tapia-Arancibia, L., Lesage, J., et Vieau, D. (2009). Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J. Neuroendocrinol* *21*, 40-48.
- Curhan, G. C., Willett, W. C., Rimm, E. B., Spiegelman, D., Ascherio, A. L., et Stampfer, M. J. (1996). Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation* *94*, 3246-3250.

- D -

- DeChiara, T. M., Efstratiadis, A., et Robertson, E. J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* *345*, 78-80.
- Delahaye, F., Breton, C., Risold, P.-Y., Enache, M., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., Lesage, J., et Vieau, D. (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* *149*, 470-475.
- Desforges, M., et Sibley, C. P. (2010). Placental nutrient supply and fetal growth. *Int. J. Dev. Biol* *54*, 377-390.
- Devaskar, S. U., Anthony, R., et Hay, W., Jr (2002). Ontogeny and insulin regulation of fetal ovine white adipose tissue leptin expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* *282*, R431-438.
- Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Knibiehler, B., et Audigier, Y. (1999). Amino acid sequence and embryonic expression of *msr/apj*, the mouse homolog of *Xenopus X-msr* and human APJ. *Mech. Dev* *84*, 199-203.
- Dray, C., Debard, C., Jager, J., Disse, E., Daviaud, D., Martin, P., Attané, C., Wanecq, E., Guigné, C., Bost, F., *et al.* (2010). Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* *298*, E1161-1169.
- Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buléon, M., Cani, P. D., Attané, C., Guigné, C., Carpené, C., *et al.* (2008). Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* *8*, 437-445.
- Dumortier, O., Blondeau, B., Duvillié, B., Reusens, B., Bréant, B., et Remacle, C. (2007). Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia* *50*, 2495-2503.

- E -

- Edinger, A. L., Hoffman, T. L., Sharron, M., Lee, B., Yi, Y., Choe, W., Kolson, D. L., Mitrovic, B., Zhou, Y., Faulds, D., *et al.* (1998). An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol* *72*, 7934-7940.
- Edwards, C. R., Benediktsson, R., Lindsay, R. S., et Seckl, J. R. (1993). Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet* *341*, 355-357.

- Einstein, F., Thompson, R. F., Bhagat, T. D., Fazzari, M. J., Verma, A., Barzilai, N., et Grealley, J. M. (2010). Cytosine methylation dysregulation in neonates following intrauterine growth restriction. *PLoS ONE* *5*, e8887.
- Eyries, M., Siegfried, G., Ciumas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F., et Soubrier, F. (2008). Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ. Res* *103*, 432-440.
- F -
- Falcão-Pires, I., Ladeiras-Lopes, R., et Leite-Moreira, A. F. (2010). The apelinergic system: a promising therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* *14*, 633-645.
- Fall, C. H. D., Yajnik, C. S., Rao, S., Davies, A. A., Brown, N., et Farrant, H. J. W. (2003). Micronutrients and fetal growth. *J. Nutr.* *133*, 1747S-1756S.
- Fichter, M. M., et Pirke, K. M. (1986). Effect of experimental and pathological weight loss upon the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* *11*, 295-305.
- Fishman, S., Caulfield, L., et de Onis (2004). Childhood and maternal underweight. Dans *Comparative quantification of health risks (WHO)*.
- Forbes, K., et Westwood, M. (2008). The IGF axis and placental function. a mini review. *Horm. Res* *69*, 129-137.
- Fowden, A. L. (1995). Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod. Fertil. Dev* *7*, 351-363.
- Fowden, A. L., et Comline, R. S. (1984). The effects of pancreatectomy on the sheep fetus in utero. *Q J Exp Physiol* *69*, 319-330.
- Fowden, A. L., Li, J., et Forhead, A. J. (1998). Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *Proc Nutr Soc* *57*, 113-122.
- Friedlander, Y., Paltiel, O., Deutsch, L., Knaanie, A., Massalha, S., Tiram, E., et Harlap, S. (2003). Birthweight and relationship with infant, child and adult mortality in the Jerusalem perinatal study. *Paediatr Perinat Epidemiol* *17*, 398-406.
- Frier, B. C., Williams, D. B., et Wright, D. C. (2009). The effects of apelin treatment on skeletal muscle mitochondrial content. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* *297*, R1761-1768.
- Frøen, J. F., Gardosi, J. O., Thurmann, A., Francis, A., et Stray-Pedersen, B. (2004). Restricted fetal growth in sudden intrauterine unexplained death. *Acta Obstet Gynecol Scand* *83*, 801-807.
- Fulroth, R., Phillips, B., et Durand, D. J. (1989). Perinatal outcome of infants exposed to cocaine and/or heroin in utero. *Am. J. Dis. Child.* *143*, 905-910.

- G -

- Gallou-Kabani, C., Gabory, A., Tost, J., Karimi, M., Mayeur, S., Lesage, J., Boudadi, E., Gross, M.-S., Taurelle, J., Vigé, A., *et al.* (2010). Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS ONE* 5, e14398.
- Gambling, L., Charania, Z., Hannah, L., Antipatis, C., Lea, R. G., et McArdle, H. J. (2002). Effect of iron deficiency on placental cytokine expression and fetal growth in the pregnant rat. *Biol. Reprod.* 66, 516-523.
- Gardosi, J., Chang, A., Kalyan, B., Sahota, D., et Symonds, E. M. (1992). Customised antenatal growth charts. *Lancet* 339, 283-287.
- Gascoin-Lachambre, G., Buffat, C., Rebourcet, R., Chelbi, S. T., Rigourd, V., Mondon, F., Mignot, T.-M., Legras, E., Simeoni, U., Vaiman, D., *et al.* (2010). Cullins in human intra-uterine growth restriction: expressional and epigenetic alterations. *Placenta* 31, 151-157.
- Gavrilova, O., Barr, V., Marcus-Samuels, B., et Reitman, M. (1997). Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem* 272, 30546-30551.
- Geary, M., Crowley, D., et Boylan, P. (1997). Passive cigarette smoking in pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 17, 264-265.
- Georgiades, P., Ferguson-Smith, A. C., et Burton, G. J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23, 3-19.
- Gesina, E., Tronche, F., Herrera, P., Duchene, B., Tales, W., Czernichow, P., et Breant, B. (2004). Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development. *Diabetes* 53, 2322-2329.
- Gilmore, J. H., Jarskog, L. F., et Vadlamudi, S. (2003). Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat. *J. Neuroimmunol* 138, 49-55.
- Giorgino, F., Almahfouz, A., Goodyear, L. J., et Smith, R. J. (1993). Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle in vivo. *J. Clin. Invest* 91, 2020-2030.
- Giraud, S., Bonod-Bidaud, C., Wesolowski-Louvel, M., et Stepien, G. (1998). Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. *J. Mol. Biol.* 281, 409-418.
- Glassford, A. J., Yue, P., Sheikh, A. Y., Chun, H. J., Zarafshar, S., Chan, D. A., Reaven, G. M., Quertermous, T., et Tsao, P. S. (2007). HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 293, E1590-1596.
- Gnanalingham, M. G., Mostyn, A., Webb, R., Keisler, D. H., Raver, N., Alves-Guerra, M. C., Pecqueur, C., Miroux, B., Symonds, M. E., et Stephenson, T. (2005). Differential effects of leptin administration on the abundance of UCP2 and glucocorticoid action during neonatal development. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E1093-1100.

- Gnanalingham, M. G., Williams, P., Wilson, V., Bispham, J., Hyatt, M. A., Pellicano, A., Budge, H., Stephenson, T., et Symonds, M. E. (2007). Nutritional manipulation between early to mid-gestation: effects on uncoupling protein-2, glucocorticoid sensitivity, IGF-I receptor and cell proliferation but not apoptosis in the ovine placenta. *Reproduction* *134*, 615-623.
- Godfrey, K. M., Sheppard, A., Gluckman, P. D., Lillycrop, K. A., Burdge, G. C., McLean, C., Rodford, J., Slater-Jefferies, J. L., Garratt, E., Crozier, S. R., *et al.* (2011). Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes* *60*, 1528-1534.
- Graham, R.-M., Chua, A.-C.-G., Herbison, C.-E., Olynyk, J.-K., et Trinder, D. (2007). Liver iron transport. *World J. Gastroenterol.* *13*, 4725-4736.
- Granström, L., Granström, L., et Backman, L. (1990). Fetal growth retardation after gastric banding. *Acta Obstet Gynecol Scand* *69*, 533-536.
- Gredilla, R., Sanz, A., Lopez-Torres, M., et Barja, G. (2001). Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.* *15*, 1589-1591.
- Gregersen, N., et Bross, P. (2010). Protein misfolding and cellular stress: an overview. *Methods Mol. Biol.* *648*, 3-23.
- Gremlich, S., Nguyen, D., Reymondin, D., Hohlfeld, P., Vial, Y., Witkin, S. S., et Gerber, S. (2007). Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. *J. Reprod. Immunol.* *74*, 143-151.
- Guo, L., Li, Q., Wang, W., Yu, P., Pan, H., Li, P., Sun, Y., et Zhang, J. (2009). Apelin inhibits insulin secretion in pancreatic beta-cells by activation of PI3-kinase-phosphodiesterase 3B. *Endocr. Res* *34*, 142-154.

- H -

- Haapasalo, A., Koponen, E., Hoppe, E., Wong, G., et Castrén, E. (2001). Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *280*, 1352-1358.
- Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., *et al.* (1999). Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* *1452*, 25-35.
- Hadlock, F. P., Harrist, R. B., Sharman, R. S., Deter, R. L., et Park, S. K. (1985). Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements--a prospective study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *151*, 333-337.
- Hafner, E., Schuchter, K., Metzenbauer, M., et Philipp, K. (2000). Uterine artery Doppler perfusion in the first and second pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* *16*, 625-629.

- Haggarty, P. (2002). Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth--a review. *Placenta 23 Suppl A*, S28-38.
- Hahn, T., Barth, S., Graf, R., Engelmann, M., Beslagic, D., Reul, J. M., Holsboer, F., Dohr, G., et Desoye, G. (1999). Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*, 1445-1452.
- Hales, C. N., Barker, D. J., Clark, P. M., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C., et Winter, P. D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* *303*, 1019-1022.
- Hales, C. N., et Barker, D. J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* *35*, 595-601.
- Han, S., Wang, G., Qi, X., Lee, H. M., Englander, E. W., et Greeley, G. H., Jr (2008). A possible role for hypoxia-induced apelin expression in enteric cell proliferation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* *294*, R1832-1839.
- Hanyu, O., Yamatani, K., Ikarashi, T., Soda, S., Maruyama, S., Kamimura, T., Kaneko, S., Hirayama, S., Suzuki, K., Nakagawa, O., *et al.* (2003). Brain-derived neurotrophic factor modulates glucagon secretion from pancreatic alpha cells: its contribution to glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab* *5*, 27-37.
- Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* *20*, 145-147.
- Harris, A., et Seckl, J. (2011). Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav* *59*, 279-289.
- Hashimoto, T., Kihara, M., Ishida, J., Imai, N., Yoshida, S.-ichiro, Toya, Y., Fukamizu, A., Kitamura, H., et Umemura, S. (2006). Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* *26*, 1267-1272.
- Haute Autorité de Santé (2009). Grossesses à risque : orientation des femmes enceintes entre les maternités en vue de l'accouchement. Available at: http://www.has-sante.fr/portail/plugins/ModuleXitiKLEE/types/FileDocument/doXiti.jsp?id=c_943287.
- Hay, W. W., Jr (1995). Metabolic interrelationships of placenta and fetus. *Placenta* *16*, 19-30.
- Heinonen, M. V., Purhonen, A. K., Miettinen, P., Pääkkönen, M., Pirinen, E., Alhava, E., Akerman, K., et Herzig, K. H. (2005). Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul. Pept* *130*, 7-13.
- Hendrix, N., et Berghella, V. (2008). Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Semin. Perinatol.* *32*, 161-165.
- Higuchi, K., Masaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., et Yoshimatsu, H. (2007). Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* *148*, 2690-2697.
- Hock, M. B., et Kralli, A. (2009). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu. Rev. Physiol.* *71*, 177-203.
- Hoek, H. W., Brown, A. S., et Susser, E. (1998). The Dutch famine and schizophrenia spectrum disorders. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* *33*, 373-379.

- Hoggard, N., Haggarty, P., Thomas, L., et Lea, R. G. (2001). Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role? *Biochem. Soc. Trans* 29, 57-63.
- Homko, C. J., Sivan, E., Reece, E. A., et Boden, G. (1999). Fuel metabolism during pregnancy. *Semin. Reprod. Endocrinol* 17, 119-125.
- Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., *et al.* (2000). Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J. Biol. Chem* 275, 21061-21067.

- I -

- Ioannou, I. M., Tsawdaroglou, N., et Sekeris, C. E. (1988). Presence of glucocorticoid responsive elements in the mitochondrial genome. *Anticancer Res.* 8, 1405-1409.
- Ishida, J., Hashimoto, T., Hashimoto, Y., Nishiwaki, S., Iguchi, T., Harada, S., Sugaya, T., Matsuzaki, H., Yamamoto, R., Shiota, N., *et al.* (2004). Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J. Biol. Chem* 279, 26274-26279.
- Iturrioz, X., Alvear-Perez, R., De Mota, N., Franchet, C., Guillier, F., Leroux, V., Dabire, H., Le Jouan, M., Chabane, H., Gerbier, R., *et al.* (2010). Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist. *FASEB J* 24, 1506-1517.

- J -

- James, P. R., et Nelson-Piercy, C. (2004). Management of hypertension before, during, and after pregnancy. *Heart* 90, 1499-1504.
- Jansson, N., Greenwood, S. L., Johansson, B. R., Powell, T. L., et Jansson, T. (2003). Leptin stimulates the activity of the system A amino acid transporter in human placental villous fragments. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 88, 1205-1211.
- Jarvenpaa, J., Vuoristo, J. T., Santaniemi, M., Ukkola, O., Savolainen, E.-R., Jääskeläinen, M., Tapanainen, J. S., Kesäniemi, A., et Ryyänen, M. (2009). Adiponectin induced placental cell apoptosis could be mediated via the ADIPOR1-receptor in pre-eclampsia with IUGR. *J Perinat Med* 37, 257-262.
- Javaid, M. K., Godfrey, K. M., Taylor, P., Robinson, S. M., Crozier, S. R., Dennison, E. M., Robinson, J. S., Breier, B. R., Arden, N. K., et Cooper, C. (2005). Umbilical cord leptin predicts neonatal bone mass. *Calcif. Tissue Int* 76, 341-347.

- Jones, H. N., Jansson, T., et Powell, T. L. (2010a). Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino acid transport in human primary trophoblast cells. *Diabetes* *59*, 1161-1170.
- Jones, H. N., Powell, T. L., et Jansson, T. (2007). Regulation of placental nutrient transport--a review. *Placenta* *28*, 763-774.
- Jones, K. R., et Reichardt, L. F. (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *87*, 8060-8064.
- Jones, M. K., Tsugawa, K., Tarnawski, A. S., et Baatar, D. (2004). Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *318*, 520-528.
- Jones, M. L., Mark, P. J., Lewis, J. L., Mori, T. A., Keelan, J. A., et Waddell, B. J. (2010b). Antioxidant defenses in the rat placenta in late gestation: increased labyrinthine expression of superoxide dismutases, glutathione peroxidase 3, and uncoupling protein 2. *Biol. Reprod.* *83*, 254-260.
- Josephs, T., Waugh, H., Kokay, I., Grattan, D., et Thompson, M. (2007). Fasting-induced adipose factor identified as a key adipokine that is up-regulated in white adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *J. Endocrinol* *194*, 305-312.

- K -

- Kajantie, E., Hytinen, T., Hovi, P., et Andersson, S. (2004). Cord plasma adiponectin: a 20-fold rise between 24 weeks gestation and term. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *89*, 4031-4036.
- Kälin, R. E., Kretz, M. P., Meyer, A. M., Kispert, A., Heppner, F. L., et Brändli, A. W. (2007a). Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev. Biol* *305*, 599-614.
- Kälin, R. E., Kretz, M. P., Meyer, A. M., Kispert, A., Heppner, F. L., et Brändli, A. W. (2007b). Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev. Biol* *305*, 599-614.
- Kaplan, D. R., et Miller, F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol* *10*, 381-391.
- Karl, P. I. (1995). Insulin-like growth factor-1 stimulates amino acid uptake by the cultured human placental trophoblast. *J. Cell. Physiol* *165*, 83-88.
- Karowicz-Bilinska, A., Kedziora-Kornatowska, K., et Bartosz, G. (2007). Indices of oxidative stress in pregnancy with fetal growth restriction. *Free Radic. Res.* *41*, 870-873.
- Kasai, A., Shintani, N., Kato, H., Matsuda, S., Gomi, F., Haba, R., Hashimoto, H., Kakuda, M., Tano, Y., et Baba, A. (2008). Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* *28*, 1717-1722.

- Kasai, A., Shintani, N., Oda, M., Kakuda, M., Hashimoto, H., Matsuda, T., Hinuma, S., et Baba, A. (2004). Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 325, 395-400.
- Katugampola, S. D., Maguire, J. J., Matthewson, S. R., et Davenport, A. P. (2001). [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br. J. Pharmacol* 132, 1255-1260.
- Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., *et al.* (2001). Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta* 1538, 162-171.
- Kawamura, K., Kawamura, N., Sato, W., Fukuda, J., Kumagai, J., et Tanaka, T. (2009). Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. *Endocrinology* 150, 3774-3782.
- Keith M., G. (2002). The Role of the Placenta in Fetal Programming – A Review. *Placenta* 23, Supplement A, S20-S27.
- Kermani, P., et Hempstead, B. (2007). Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med* 17, 140-143.
- Kermani, P., Rafii, D., Jin, D. K., Whitlock, P., Schaffer, W., Chiang, A., Vincent, L., Friedrich, M., Shido, K., Hackett, N. R., *et al.* (2005). Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J. Clin. Invest* 115, 653-663.
- Khong, T. Y., De Wolf, F., Robertson, W. B., et Brosens, I. (1986). Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 93, 1049-1059.
- Khoury, M. J., Erickson, J. D., Cordero, J. F., et McCarthy, B. J. (1988). Congenital malformations and intrauterine growth retardation: a population study. *Pediatrics* 82, 83-90.
- Kidoya, H., Ueno, M., Yamada, Y., Mochizuki, N., Nakata, M., Yano, T., Fujii, R., et Takakura, N. (2008). Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J* 27, 522-534.
- Kilpeläinen, T. O., den Hoed, M., Ong, K. K., Grøntved, A., Brage, S., Jameson, K., Cooper, C., Khaw, K.-T., Ekelund, U., Wareham, N. J., *et al.* (2011). Obesity-susceptibility loci have a limited influence on birth weight: a meta-analysis of up to 28,219 individuals. *Am. J. Clin. Nutr* 93, 851-860.
- Kim, H., Toyofuku, Y., Lynn, F. C., Chak, E., Uchida, T., Mizukami, H., Fujitani, Y., Kawamori, R., Miyatsuka, T., Kosaka, Y., *et al.* (2010). Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat. Med.* 16, 804-808.
- Kimura, A. P., Liebhaber, S. A., et Cooke, N. E. (2004). Epigenetic modifications at the human growth hormone locus predict distinct roles for histone acetylation and methylation in placental gene activation. *Mol. Endocrinol* 18, 1018-1032.
- King, J. C. (2003). The risk of maternal nutritional depletion and poor outcomes increases in early or closely spaced pregnancies. *J. Nutr.* 133, 1732S-1736S.

- Kirchengast, S., et Hartmann, B. (2003). Impact of maternal age and maternal somatic characteristics on newborn size. *Am. J. Hum. Biol* 15, 220-228.
- Klauwer, D., Blum, W. F., Hanitsch, S., Rascher, W., Lee, P. D., et Kiess, W. (1997). IGF-I, IGF-II, free IGF-I and IGFBP-1, -2 and -3 levels in venous cord blood: relationship to birthweight, length and gestational age in healthy newborns. *Acta Paediatr* 86, 826-833.
- Kleinz, M. J., et Davenport, A. P. (2005). Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol. Ther* 107, 198-211.
- Kleinz, M. J., et Davenport, A. P. (2004). Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul. Pept* 118, 119-125.
- Kniss, D. A., Shubert, P. J., Zimmerman, P. D., Landon, M. B., et Gabbe, S. G. (1994). Insulinlike growth factors. Their regulation of glucose and amino acid transport in placental trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi. *J Reprod Med* 39, 249-256.
- Knöfler, M., Simmons, D. G., Lash, G. E., Harris, L. K., et Armant, D. R. (2008). Regulation of trophoblast invasion - a workshop report. *Placenta* 29 *Suppl A*, S26-28.
- Kodomari, I., Wada, E., Nakamura, S., et Wada, K. (2009). Maternal supply of BDNF to mouse fetal brain through the placenta. *Neurochem. Int* 54, 95-98.
- Könner, A. C., Klöckener, T., et Brüning, J. C. (2009). Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol. Behav* 97, 632-638.
- Kossenjans, W., Eis, A., Sahay, R., Brockman, D., et Myatt, L. (2000). Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H1311-1319.
- Kourtis, A., Gkiomisi, A., Mouzaki, M., Makedou, K., Anastasilakis, A. D., Toulis, K. A., Gerou, S., Gavana, E., et Agorastos, T. (2011). Apelin levels in normal pregnancy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 75, 367-371.
- Kramer, M. S., Olivier, M., McLean, F. H., Willis, D. M., et Usher, R. H. (1990). Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality on fetal and neonatal outcome. *Pediatrics* 86, 707-713.
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K., et Moestrup, S. K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201.
- Kyle, U. G., et 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 -

- Ladyman, S. R., et Grattan, D. R. (2004). Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* *145*, 3704-3711.
- Ladyman, S. R., et Grattan, D. R. (2005). Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. *Endocrinology* *146*, 3868-3874.
- Ladyman, S. R., Tups, A., Augustine, R. A., Swahn-Azavedo, A., Kokay, I. C., et Grattan, D. R. (2009). Loss of hypothalamic response to leptin during pregnancy associated with development of melanocortin resistance. *J. Neuroendocrinol* *21*, 449-456.
- Langdown, M. L., et Sugden, M. C. (2001). Enhanced placental GLUT1 and GLUT3 expression in dexamethasone-induced fetal growth retardation. *Mol. Cell. Endocrinol* *185*, 109-117.
- Largo, R. H., Wälli, R., Duc, G., Fanconi, A., et Prader, A. (1980). Evaluation of perinatal growth. Presentation of combined intra- and extrauterine growth standards for weight, length and head circumference. *Helv Paediatr Acta* *35*, 419-436.
- Lattuada, D., Colleoni, F., Martinelli, A., Garretto, A., Magni, R., Radaelli, T., et Cetin, I. (2008). Higher mitochondrial DNA content in human IUGR placenta. *Placenta* *29*, 1029-1033.
- Leach, L., Bhasin, Y., Clark, P., et Firth, J. A. (1994). Isolation of endothelial cells from human term placental villi using immunomagnetic beads. *Placenta* *15*, 355-364.
- Leduc, L., Levy, E., Bouity-Voubou, M., et Delvin, E. (2010). Fetal programming of atherosclerosis: possible role of the mitochondria. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *149*, 127-130.
- Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., Osmond, D. H., George, S. R., et O'Dowd, B. F. (2000). Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J. Neurochem* *74*, 34-41.
- Lee, H.-H., Kim, H., Lee, J.-W., Kim, Y.-S., Yang, H.-Y., Chang, H.-K., Lee, T.-H., Shin, M.-C., Lee, M.-H., Shin, M.-S., *et al.* (2006). Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Dev* *28*, 147-154.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., et Hempstead, B. L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* *294*, 1945-1948.
- Leroy, B., et Lefort, F. (1971). [The weight and size of newborn infants at birth]. *Rev Fr Gynecol Obstet* *66*, 391-396.
- Lesage, J., Blondeau, B., Grino, M., Bréant, B., et 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., Hahn, D., Léonhardt, M., Blondeau, B., Bréant, B., et Dupouy, J. P. (2002). 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.

- Levitt, N. S., Lambert, E. V., Woods, D., Hales, C. N., Andrew, R., et Seckl, J. R. (2000). Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young south african adults: early programming of cortisol axis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 4611-4618.
- Lewis, R. M., Forhead, A. J., Petry, C. J., Ozanne, S. E., et Hales, C. N. (2002). Long-term programming of blood pressure by maternal dietary iron restriction in the rat. *Br. J. Nutr.* *88*, 283-290.
- Li, E., Bestor, T. H., et Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* *69*, 915-926.
- Li, R., Xia, W., Zhang, Z., et Wu, K. (2011a). S100B Protein, Brain-Derived Neurotrophic Factor, and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Human Milk. *PLoS ONE* *6*, e21663.
- Li, Y., He, Y., Qi, L., Jaddoe, V. W., Feskens, E. J. M., Yang, X., Ma, G., et Hu, F. B. (2010). Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hyperglycemia and type 2 diabetes in adulthood. *Diabetes* *59*, 2400-2406.
- Li, Y., Jaddoe, V. W., Qi, L., He, Y., Wang, D., Lai, J., Zhang, J., Fu, P., Yang, X., et Hu, F. B. (2011b). Exposure to the chinese famine in early life and the risk of metabolic syndrome in adulthood. *Diabetes Care* *34*, 1014-1018.
- Lindsay, R. S., Lindsay, R. M., Edwards, C. R., et Seckl, J. R. (1996a). Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension* *27*, 1200-1204.
- Lindsay, R. S., Lindsay, R. M., Waddell, B. J., et Seckl, J. R. (1996b). Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia* *39*, 1299-1305.
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., et Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* *75*, 59-72.
- Liu, Q.-R., Walther, D., Drgon, T., Polesskaya, O., Lesnick, T. G., Strain, K. J., de Andrade, M., Bower, J. H., Maraganore, D. M., et Uhl, G. R. (2005). Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet* *134B*, 93-103.
- Loos, R. J. F., Beunen, G., Fagard, R., Derom, C., et Vlietinck, R. (2002). Birth weight and body composition in young women: a prospective twin study. *Am. J. Clin. Nutr.* *75*, 676-682.
- Loos, R. J., Beunen, G., Fagard, R., Derom, C., et Vlietinck, R. (2001). Birth weight and body composition in young adult men--a prospective twin study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *25*, 1537-1545.
- López-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M. V., Allard, J., Ingram, D. K., Navas, P., *et al.* (2006). Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 1768-1773.
- Lu, B., Pang, P. T., et Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci* *6*, 603-614.

- Lubchenco, L. O., Hansman, C., et Boyd, E. (1966). Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. *Pediatrics* 37, 403-408.
- Lukaszewski, M.-A., Mayeur, S., Fajardy, I., Delahaye, F., Dutriez-Casteloot, I., Montel, V., Dickes-Coopman, A., Laborie, C., Lesage, J., Vieau, D., *et al.* (2011). Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21712534> [Consulté juillet 11, 2011].
- Lumey, L. H. (1998). Compensatory placental growth after restricted maternal nutrition in early pregnancy. *Placenta* 19, 105-111.
- Lynch, G., Rex, C. S., Chen, L. Y., et Gall, C. M. (2008). The substrates of memory: defects, treatments, and enhancement. *Eur. J. Pharmacol* 585, 2-13.
- Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., Wihler, C., Koliatsos, V. E., et Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 15239-15244.
- M -
- Magariños, M. P., Sánchez-Margalet, V., Kotler, M., Calvo, J. C., et Varone, C. L. (2007). Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol. Reprod* 76, 203-210.
- Malamitsi-Puchner, A., Gourgiotis, D., Boutsikou, M., Baka, S., Hassiakos, D., et Briana, D. D. (2007). Circulating apelin concentrations in mother/infant pairs at term. *Acta Paediatr* 96, 1751-1754.
- Malassiné, A., Frendo, J. L., et Evain-Brion, D. (2003). A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum. Reprod. Update* 9, 531-539.
- Mamelle, N., Munoz, F., et Grandjean, H. (1996). [Fetal growth from the AUDIPOG study. I. Establishment of reference curves]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 25, 61-70.
- Mann, P. E., Rubin, B. S., et Bridges, R. S. (1997). Differential proopiomelanocortin gene expression in the medial basal hypothalamus of rats during pregnancy and lactation. *Brain Res. Mol. Brain Res* 46, 9-16.
- Manning, F. A., Hill, L. M., et Platt, L. D. (1981). Qualitative amniotic fluid volume determination by ultrasound: antepartum detection of intrauterine growth retardation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 139, 254-258.
- Manning, F., et Hohler, C. (1991). Intrauterine growth retardation: Diagnosis, prognostication, and management based on ultrasound methods. Dans *The Principles and Practices of Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology*.
- Mari, G., et Picconi, J. (2008). Doppler vascular changes in intrauterine growth restriction. *Semin. Perinatol.* 32, 182-189.

- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., et Sun, Y. E. (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302, 890-893.
- Masoro, E. J. (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126, 913-922.
- Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., et Audigier, Y. (2004). Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 18, 1909-1911.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., *et al.* (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med* 3, 1029-1033.
- Mathews, F., Yudkin, P., et Neil, A. (1999). Influence of maternal nutrition on outcome of pregnancy: prospective cohort study. *BMJ* 319, 339-343.
- Mayeur, S., Lukaszewski, M. A., Breton, C., Storme, L., Vieau, D., et Lesage, J. (2011). Do neurotrophins regulate the feto-placental development? *Med. Hypotheses* 76, 726-728.
- Mayeur, S., Silhol, M., Moitrot, E., Barboux, S., Breton, C., Gabory, A., Vaiman, D., Dutriez-Casteloot, I., Fajardy, I., Vambergue, A., *et al.* (2010). Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human. *Placenta* 31, 785-791.
- Mayhew, T. M., Charnock-Jones, D. S., et Kaufmann, P. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 25, 127-139.
- McCurdy, C. E., Bishop, J. M., Williams, S. M., Grayson, B. E., Smith, M. S., Friedman, J. E., et Grove, K. L. (2009). Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* 119, 323-335.
- McIntire, D. D., Bloom, S. L., Casey, B. M., et Leveno, K. J. (1999). Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N. Engl. J. Med.* 340, 1234-1238.
- Melamed-Frank, M., Lache, O., Enav, B. I., Szafrank, T., Levy, N. S., Ricklis, R. M., et Levy, A. P. (2001). Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* 98, 3693-3698.
- Michaelsen, K., Zagrebelsky, M., Berndt-Huch, J., Polack, M., Buschler, A., Sendtner, M., et Korte, M. (2010). Neurotrophin receptors TrkB.T1 and p75NTR cooperate in modulating both functional and structural plasticity in mature hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci* 32, 1854-1865.
- Mills, J. L., Graubard, B. I., Harley, E. E., Rhoads, G. G., et Berendes, H. W. (1984). Maternal alcohol consumption and birth weight. How much drinking during pregnancy is safe? *JAMA* 252, 1875-1879.
- Mineva, I., Stamenova, M., Gartner, W., et Wagner, L. (2008). Expression of the small heat shock protein alphaB-crystallin in term human placenta. *Am. J. Reprod. Immunol.* 60, 440-448.
- Monteleone, P., Tortorella, A., Martiadis, V., Serritella, C., Fuschino, A., et Maj, M. (2004). Opposite changes in the serum brain-derived neurotrophic factor in anorexia nervosa and obesity. *Psychosom Med* 66, 744-748.

- Morgan, A. R., Thompson, J. M. D., Murphy, R., Black, P. N., Lam, W.-J., Ferguson, L. R., et Mitchell, E. A. (2010). Obesity and diabetes genes are associated with being born small for gestational age: results from the Auckland Birthweight Collaborative study. *BMC Med. Genet* *11*, 125.
- Morris Buus, R., et Boockfor, F. R. (2004). Transferrin expression by placental trophoblastic cells. *Placenta* *25*, 45-52.
- Morton, N. E. (1955). The inheritance of human birth weight. *Ann. Hum. Genet* *20*, 125-134.
- De Mota, N., Lenkei, Z., et Llorens-Cortès, C. (2000). Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* *72*, 400-407.
- De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., Kordon, C., Vaudry, H., Moos, F., et Llorens-Cortès, C. (2004). Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *101*, 10464-10469.
- Mounzih, K., Qiu, J., Ewart-Toland, A., et Chehab, F. F. (1998a). Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology* *139*, 5259-5262.
- Mounzih, K., Qiu, J., Ewart-Toland, A., et Chehab, F. F. (1998b). Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology* *139*, 5259-5262.
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., et Murphy, R. A. (2001a). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem* *276*, 12660-12666.
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., et Murphy, R. A. (2001b). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem* *276*, 12660-12666.
- Mowla, S. J., Pareek, S., Farhadi, H. F., Petrecca, K., Fawcett, J. P., Seidah, N. G., Morris, S. J., Sossin, W. S., et Murphy, R. A. (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci* *19*, 2069-2080.
- Myatt, L. (2010). Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* *31 Suppl*, S66-69.

- N -

- Naeye, R. L., Blanc, W., Leblanc, W., et Khatamee, M. A. (1973). Fetal complications of maternal heroin addiction: abnormal growth, infections, and episodes of stress. *J. Pediatr.* *83*, 1055-1061.

- Nakagawa, T., Tsuchida, A., Itakura, Y., Nonomura, T., Ono, M., Hirota, F., Inoue, T., Nakayama, C., Taiji, M., et Noguchi, H. (2000). Brain-derived neurotrophic factor regulates glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. *Diabetes* 49, 436-444.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D. B., et Monaco, J. J. (1997). Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J.* 16, 5363-5375.
- Neitzke, U., Harder, T., Schellong, K., Melchior, K., Ziska, T., Rodekamp, E., Dudenhausen, J. W., et Plagemann, A. (2008). Intrauterine growth restriction in a rodent model and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal of the experimental evidence. *Placenta* 29, 246-254.
- Nelissen, E. C. M., van Montfoort, A. P. A., Dumoulin, J. C. M., et Evers, J. L. H. (2011). Epigenetics and the placenta. *Hum. Reprod. Update* 17, 397-417.
- Nelson, T., Shulman, G., Grainger, D., et Diamond, M. P. (1994). Progesterone administration induced impairment of insulin suppression of hepatic glucose production. *Fertil. Steril* 62, 491-496.
- Nüsken, K.-D., Dötsch, J., Rauh, M., Rascher, W., et Schneider, H. (2008). Uteroplacental insufficiency after bilateral uterine artery ligation in the rat: impact on postnatal glucose and lipid metabolism and evidence for metabolic programming of the offspring by sham operation. *Endocrinology* 149, 1056-1063.

- O -

- O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., Shi, X., Petronis, A., George, S. R., et Nguyen, T. (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136, 355-360.
- O'Rahilly, R., et Müller, F. (1987). *Developmental stages in human embryos*. (Washington Publication).
- O'Shea, M., Hansen, M. J., Tatemoto, K., et Morris, M. J. (2003). Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci* 6, 163-167.
- OMS (2010). *Domaine d'activité: nutrition, rapport de situation*. Available at: http://www.who.int/mip2001/files/2243/MIP_01_APR_SDE_3.fr.pdf.
- Ong, K. K. L., Preece, M. A., Emmett, P. M., Ahmed, M. L., et Dunger, D. B. (2002). Size at birth and early childhood growth in relation to maternal smoking, parity and infant breast-feeding: longitudinal birth cohort study and analysis. *Pediatr. Res* 52, 863-867.
- Osmanağaoğlu, M. A., Osmanağaoğlu, S., et Bozkaya, H. (2005). The association of birthweight with maternal and cord serum and amniotic fluid growth hormone and insulin levels, and with neonatal and maternal factors in pregnant women who delivered at term. *J Perinat Med* 33, 149-155.

- Ounsted, M., Scott, A., et Moar, V. A. (1988). Constrained and unconstrained fetal growth: associations with some biological and pathological factors. *Ann. Hum. Biol* 15, 119-129.
- Ozanne, S. E., et Hales, C. N. (2004). Lifespan: Catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 427, 411-412.
- Ozanne, S. E., Wang, C. L., Dorling, M. W., et Petry, C. J. (1999). Dissection of the metabolic actions of insulin in adipocytes from early growth-retarded male rats. *J. Endocrinol.* 162, 313-319.

- P -

- Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., et Wellman, C. L. (1995). Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp. Neurol* 131, 229-238.
- Pencea, V., Bingaman, K. D., Wiegand, S. J., et Luskin, M. B. (2001). Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J. Neurosci* 21, 6706-6717.
- Peterside, I. E., Selak, M. A., et Simmons, R. A. (2003). Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1258-1266.
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., et Vulpe, C. D. (2008). Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8, 1744-1749.
- Petrik, J., Reusens, B., Arany, E., Remacle, C., Coelho, C., Hoet, J. J., et Hill, D. J. (1999). A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 140, 4861-4873.
- Petry, C. J., Ozanne, S. E., Wang, C. L., et Hales, C. N. (2000). Effects of early protein restriction and adult obesity on rat pancreatic hormone content and glucose tolerance. *Horm. Metab. Res.* 32, 233-239.
- Phipps, K., Barker, D. J., Hales, C. N., Fall, C. H., Osmond, C., et Clark, P. M. (1993). Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia* 36, 225-228.
- Piedrahita, J. A. (2011). The role of imprinted genes in fetal growth abnormalities. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol* 91, 682-692.
- Pinar, H., Basu, S., Hotmire, K., Laffineuse, L., Presley, L., Carpenter, M., Catalano, P. M., et Hauguel-de Mouzon, S. (2008). High molecular mass multimer complexes and vascular expression contribute to high adiponectin in the fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 93, 2885-2890.
- Platz, E., et Newman, R. (2008). Diagnosis of IUGR: traditional biometry. *Semin. Perinatol.* 32, 140-147.

- Poduslo, J. F., et Curran, G. L. (1996). Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res. Mol. Brain Res* 36, 280-286.
- Polonovski, C. (1992). Importance de la nutrition prénatale. *Expansion scientifique française*, 34-48.
- Pruunsild, P., Kazantseva, A., Aid, T., Palm, K., et Timmusk, T. (2007). Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90, 397-406.
- Psarra, A.-M. G., et Sekeris, C. E. (2009). Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 431-436.
- R -**
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4003-4008.
- Rahnama, F., Shafiei, F., Gluckman, P. D., Mitchell, M. D., et Lobie, P. E. (2006). Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion. *Endocrinology* 147, 5275-5283.
- Raio, L., Ghezzi, F., Di Naro, E., Duwe, D. G., Cromi, A., et Schneider, H. (2003). Umbilical cord morphologic characteristics and umbilical artery Doppler parameters in intrauterine growth-restricted fetuses. *J Ultrasound Med* 22, 1341-1347.
- Rajakumar, A., Michael, H. M., Daftary, A., Jeyabalan, A., Gilmour, C., et Conrad, K. P. (2008). Proteasomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF-alpha proteins. *Placenta* 29, 290-299.
- Ravelli, A. C., van Der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., et Bleker, O. P. (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 811-816.
- Ravelli, A. C., van der Meulen, J. H., Michels, R. P., Osmond, C., Barker, D. J., Hales, C. N., et Bleker, O. P. (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351, 173-177.
- Reaux, A., De Mota, N., Skultetyova, I., Lenkei, Z., El Messari, S., Gallatz, K., Corvol, P., Palkovits, M., et Llorens-Cortès, C. (2001). Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem* 77, 1085-1096.
- Reaux-Le Goazigo, A., Morinville, A., Burlet, A., Llorens-Cortes, C., et Beaudet, A. (2004). Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* 145, 4392-4400.
- Rees, W. D., Hay, S. M., Cruickshank, M., Reusens, B., Remacle, C., Antipatis, C., et Grant, G. (2006). Maternal protein intake in the pregnant rat programs the insulin axis and body composition in the offspring. *Metab. Clin. Exp.* 55, 642-649.

- Regnault, T. R. H., de Vrijer, B., Galan, H. L., Davidsen, M. L., Trembler, K. A., Battaglia, F. C., Wilkening, R. B., et Anthony, R. V. (2003). The relationship between transplacental O₂ diffusion and placental expression of PlGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. *J. Physiol. (Lond.)* *550*, 641-656.
- Reusens, B., Theys, N., et Remacle, C. (2011). Alteration of mitochondrial function in adult rat offspring of malnourished dams. *World J Diabetes* *2*, 149-157.
- Richardus, J. H., Graafmans, W. C., Verloove-Vanhorick, S. P., et Mackenbach, J. P. (2003). Differences in perinatal mortality and suboptimal care between 10 European regions: results of an international audit. *BJOG* *110*, 97-105.
- Rich-Edwards, J. W., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Gillman, M. W., Hennekens, C. H., Speizer, F. E., et Manson, J. E. (1999). Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women. *Ann. Intern. Med.* *130*, 278-284.
- Ringström, C., Nitert, M. D., Bennet, H., Fex, M., Valet, P., Rehfeld, J. F., Friis-Hansen, L., et Wierup, N. (2010). Apelin is a novel islet peptide. *Regul. Pept* *162*, 44-51.
- Rivière, G., Michaud, A., Breton, C., VanCamp, G., Laborie, C., Enache, M., Lesage, J., Deloof, S., Corvol, P., et 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., et Bear, J. (1997). Studies of modern man. *Annual review of anthropology* *1*, 55-112.
- Roberts, C. T., Sohlstrom, A., Kind, K. L., Earl, R. A., Khong, T. Y., Robinson, J. S., Owens, P. C., et Owens, J. A. (2001). Maternal food restriction reduces the exchange surface area and increases the barrier thickness of the placenta in the guinea-pig. *Placenta* *22*, 177-185.
- Roberts, E. M., Newson, M. J. F., Pope, G. R., Landgraf, R., Lolait, S. J., et O'Carroll, A.-M. (2009). Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice. *J. Endocrinol* *202*, 453-462.
- Robinson, L. L. L., Townsend, J., et Anderson, R. A. (2003). The human fetal testis is a site of expression of neurotrophins and their receptors: regulation of the germ cell and peritubular cell population. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *88*, 3943-3951.
- Rocha, M., Bing, C., Williams, G., et Puerta, M. (2003). Pregnancy-induced hyperphagia is associated with increased gene expression of hypothalamic agouti-related peptide in rats. *Regul. Pept* *114*, 159-165.
- Rolfe, D. F., et Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* *77*, 731-758.
- Ronkainen, V.-P., Ronkainen, J. J., Hänninen, S. L., Leskinen, H., Ruas, J. L., Pereira, T., Poellinger, L., Vuolteenaho, O., et Tavi, P. (2007). Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J* *21*, 1821-1830.
- Rose, C. R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K. W., et Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* *426*, 74-78.
- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., Ravelli, A. C., et Bleker, O. P. (2000a). Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am. J. Clin. Nutr.* *72*, 1101-1106.

- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J., Ravelli, A. C., Schroeder-Tanka, J. M., van Montfrans, G. A., Michels, R. P., et Bleker, O. P. (2000b). Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart* 84, 595-598.
- Roseboom, T. J., van der Meulen, J. H., Ravelli, A. C., van Montfrans, G. A., Osmond, C., Barker, D. J., et Bleker, O. P. (1999). Blood pressure in adults after prenatal exposure to famine. *J. Hypertens.* 17, 325-330.
- Rosenberg, A. (2008). The IUGR newborn. *Semin. Perinatol* 32, 219-224.
- S -
- Saenger, P., Czernichow, P., Hughes, I., et Reiter, E. O. (2007). Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr. Rev.* 28, 219-251.
- Saint-Geniez, M., Argence, C. B., Knibiehler, B., et Audigier, Y. (2003). The msr/apj gene encoding the apelin receptor is an early and specific marker of the venous phenotype in the retinal vasculature. *Gene Expr. Patterns* 3, 467-472.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Grégoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Lévi-Meyrueis, C., *et al.* (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 34611-34615.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., et Dean, W. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev. Biol* 241, 172-182.
- Santulli, P., Mandelbrot, L., Facchiano, E., Dussaux, C., Ceccaldi, P.-F., Ledoux, S., et Msika, S. (2010). Obstetrical and neonatal outcomes of pregnancies following gastric bypass surgery: a retrospective cohort study in a French referral centre. *Obes Surg* 20, 1501-1508.
- Sarwer, D. B., Allison, K. C., Gibbons, L. M., Markowitz, J. T., et Nelson, D. B. (2006). Pregnancy and obesity: a review and agenda for future research. *J Womens Health (Larchmt)* 15, 720-733.
- Scholl, T. O. (2005). Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 1218S-1222S.
- Seckl, J. R. (1993). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms and their implications for blood pressure regulation. *Eur. J. Clin. Invest.* 23, 589-601.
- Seeber, R. M., Smith, J. T., et Waddell, B. J. (2002). Plasma leptin-binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat. *Biol. Reprod* 66, 1762-1767.
- Selak, M. A., Storey, B. T., Peterside, I., et Simmons, R. A. (2003). Impaired oxidative phosphorylation in skeletal muscle of intrauterine growth-retarded rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E130-137.

- Serman, L., Vlahović, M., Sijan, M., Bulić-Jakus, F., Serman, A., Sincić, N., Matijević, R., Jurić-Lekić, G., et Katusić, A. (2007). The impact of 5-azacytidine on placental weight, glycoprotein pattern and proliferating cell nuclear antigen expression in rat placenta. *Placenta* 28, 803-811.
- Sibley, C. P., Coan, P. M., Ferguson-Smith, A. C., Dean, W., Hughes, J., Smith, P., Reik, W., Burton, G. J., Fowden, A. L., et Constância, M. (2004). Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 8204-8208.
- Sibley, C., Glazier, J., et D'Souza, S. (1997). Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp. Physiol* 82, 389-402.
- Silhol, M., Bonnichon, V., Rage, F., et Tapia-Arancibia, L. (2005). Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132, 613-624.
- Simmons, R. A., Templeton, L. J., et Gertz, S. J. (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 50, 2279-2286.
- Singhal, A., Wells, J., Cole, T. J., Fewtrell, M., et Lucas, A. (2003). Programming of lean body mass: a link between birth weight, obesity, and cardiovascular disease? *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 726-730.
- Singhal, U., Mohsin, S., Saini, K., et Singhal, K. C. (1993). Serum level of iron and transferrin in normal and anaemic pregnant women. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 37, 71-74.
- Sivan, E., Mazaki-Tovi, S., Pariente, C., Efraty, Y., Schiff, E., Hemi, R., et Kanety, H. (2003). Adiponectin in human cord blood: relation to fetal birth weight and gender. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 88, 5656-5660.
- Snell, L. H., Haughey, B. P., Buck, G., et Marecki, M. A. (1998). Metabolic crisis: hyperemesis gravidarum. *J Perinat Neonatal Nurs* 12, 26-37.
- Snoeck, A., Remacle, C., Reusens, B., et Hoet, J. J. (1990). Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol. Neonate* 57, 107-118.
- Sørensen, H. T., Sabroe, S., Rothman, K. J., Gillman, M., Steffensen, F. H., Fischer, P., et Sørensen, T. I. (1999). Birth weight and length as predictors for adult height. *Am. J. Epidemiol.* 149, 726-729.
- Sorenson, R. L., et Brelje, T. C. (1997). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm. Metab. Res* 29, 301-307.
- Sörhede Winzell, M., Magnusson, C., et Ahrén, B. (2005). The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul. Pept* 131, 12-17.
- Soriguer, F., Garrido-Sanchez, L., Garcia-Serrano, S., Garcia-Almeida, J. M., Garcia-Arnes, J., Tinahones, F. J., et Garcia-Fuentes, E. (2009). Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg* 19, 1574-1580.
- Sorli, S. C., Le Gonidec, S., Knibiehler, B., et Audigier, Y. (2007). Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene* 26, 7692-7699.

- Souza, J. M., Choi, I., Chen, Q., Weisse, M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Obin, M., Ara, J., Horwitz, J., et Ischiropoulos, H. (2000). Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 380, 360-366.
- Sreekumar, R., Unnikrishnan, J., Fu, A., Nygren, J., Short, K. R., Schimke, J., Barazzoni, R., et Nair, K. S. (2002). Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E38-43.
- 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.
- Stanner, S. A., Bulmer, K., Andrès, C., Lantseva, O. E., Borodina, V., Poteen, V. V., et Yudkin, J. S. (1997). Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ* 315, 1342-1348.
- Stark, M. J., Hodyl, N. A., Wright, I. M. R., et Clifton, V. L. (2011). Influence of sex and glucocorticoid exposure on preterm placental pro-oxidant-antioxidant balance. *Placenta*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903264> [Consulté septembre 27, 2011].
- Stein, Z., et Susser, M. (1975). The Dutch famine, 1944-1945, and the reproductive process. II. Interrelations of caloric rations and six indices at birth. *Pediatr. Res.* 9, 76-83.
- Stepien, G., Torroni, A., Chung, A. B., Hodge, J. A., et Wallace, D. C. (1992). Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 267, 14592-14597.
- Styrud, J., Eriksson, U. J., Grill, V., et Swenne, I. (2005). Experimental intrauterine growth retardation in the rat causes a reduction of pancreatic B-cell mass, which persists into adulthood. *Biol. Neonate* 88, 122-128.
- Sullivan, A. D., Nyirenda, T., Cullinan, T., Taylor, T., Harlow, S. D., James, S. A., et Meshnick, S. R. (1999). Malaria Infection during Pregnancy: Intrauterine Growth Retardation and Preterm Delivery in Malawi. *Journal of Infectious Diseases* 179, 1580 -1583.
- Sunter, D., Hewson, A. K., et Dickson, S. L. (2003). Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci. Lett* 353, 1-4.

- T -

- Taheri, S., Murphy, K., Cohen, M., Sujkovic, E., Kennedy, A., Dhillon, W., Dakin, C., Sajedi, A., Ghatei, M., et Bloom, S. (2002). The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 291, 1208-1212.
- Takakura, N., et Kidoya, H. (2009). Maturation of blood vessels by haematopoietic stem cells and progenitor cells: involvement of apelin/APJ and angiopoietin/Tie2 interactions in vessel caliber size regulation. *Thromb. Haemost* 101, 999-1005.

- Talaulikar, V. S., et Arulkumaran, S. (2011). Folic acid in obstetric practice: a review. *Obstet Gynecol Surv* 66, 240-247.
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., et Arancibia, S. (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* 25, 77-107.
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M. X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., *et al.* (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 251, 471-476.
- Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M. X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., et Fujimiya, M. (2001). The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul. Pept* 99, 87-92.
- Telejko, B., Kuzmicki, M., Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Szamatowicz, J., Nikolajuk, A., Zonenberg, A., Zwierz-Gugala, D., Jelski, W., Laudański, P., Wilczynski, J., *et al.* (2010). Plasma apelin levels and apelin/APJ mRNA expression in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract* 87, 176-183.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F. S., *et al.* (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci* 25, 5455-5463.
- Thaler, I., Manor, D., Itskovitz, J., Rottem, S., Levit, N., Timor-Tritsch, I., et Brandes, J. M. (1990). Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol* 162, 121-125.
- Theys, N., Ahn, M.-T., Bouckenooghe, T., Reusens, B., et Remacle, C. (2011). Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *J. Nutr. Biochem.* 22, 985-994.
- Theys, N., Bouckenooghe, T., Ahn, M.-T., Remacle, C., et Reusens, B. (2009a). Maternal low-protein diet alters pancreatic islet mitochondrial function in a sex-specific manner in the adult rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1516-1525.
- Theys, N., Clippe, A., Bouckenooghe, T., Reusens, B., et Remacle, C. (2009b). Early low protein diet aggravates unbalance between antioxidant enzymes leading to islet dysfunction. *PLoS ONE* 4, e6110.
- Thompson, R. F., Fazzari, M. J., Niu, H., Barzilai, N., Simmons, R. A., et Grealley, J. M. (2010). Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats. *J. Biol. Chem.* 285, 15111-15118.

- U -

- Ueland, K. (1976). Maternal cardiovascular dynamics. VII. Intrapartum blood volume changes. *Am. J. Obstet. Gynecol* 126, 671-677.

Umbers, A. J., Aitken, E. H., et Rogerson, S. J. (2011). Malaria in pregnancy: small babies, big problem. *Trends Parasitol.* 27, 168-175.

Unger, T. J., Calderon, G. A., Bradley, L. C., Sena-Esteves, M., et Rios, M. (2007). Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *J. Neurosci* 27, 14265-14274.

- V -

Valle, A., Hoggard, N., Adams, A. C., Roca, P., et Speakman, J. R. (2008). Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *J. Neuroendocrinol* 20, 79-84.

Valtat, B., Dupuis, C., Zenaty, D., Singh-Estivalet, A., Tronche, F., Bréant, B., et Blondeau, B. (2011). Genetic evidence of the programming of beta cell mass and function by glucocorticoids in mice. *Diabetologia* 54, 350-359.

Varvarigou, A., Mantzoros, C. S., et Beratis, N. G. (1999). Cord blood leptin concentrations in relation to intrauterine growth. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 50, 177-183.

Vasavada, R. C., Garcia-Ocaña, A., Zawalich, W. S., Sorenson, R. L., Dann, P., Syed, M., Ogren, L., Talamantes, F., et Stewart, A. F. (2000). Targeted expression of placental lactogen in the beta cells of transgenic mice results in beta cell proliferation, islet mass augmentation, and hypoglycemia. *J. Biol. Chem* 275, 15399-15406.

Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., *et al.* (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem* 277, 14838-14843.

Vidal-Puig, A. J., Grujic, D., Zhang, C. Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., *et al.* (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 16258-16266.

- W -

Wadsworth, M. E., Cripps, H. A., Midwinter, R. E., et Colley, J. R. (1985). Blood pressure in a national birth cohort at the age of 36 related to social and familial factors, smoking, and body mass. *Br Med J (Clin Res Ed)* 291, 1534-1538.

Wallace, J. M., Bourke, D. A., Aitken, R. P., Milne, J. S., et Hay, W. W., Jr (2003). Placental glucose transport in growth-restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. *J. Physiol. (Lond.)* 547, 85-94.

- Wallace, J. M., Bourke, D. A., et Aitken, R. P. (1999). Nutrition and fetal growth: paradoxical effects in the overnourished adolescent sheep. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 54, 385-399.
- Walton, A., et Hammond, J. (1938). The maternal effects on growth and conformation in Shire horse-Shetland pony crosses. *Proceeding of the Royal Society of London*, 311-335.
- Wang, C.-F., et Ye, L.-Y. (2008). [Relationship between brain-derived neurotrophic factor and birth weight in neonates]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 10, 70-72.
- Wang, G., Anini, Y., Wei, W., Qi, X., OCarroll, A.-M., Mochizuki, T., Wang, H.-Q., Hellmich, M. R., Englander, E. W., et Greeley, G. H., Jr (2004). Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 145, 1342-1348.
- Wang, L., et Xu, R.-J. (2007). The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 16 Suppl 1, 467-472.
- Wang, L., Wang, X., Laird, N., Zuckerman, B., Stubblefield, P., et Xu, X. (2006). Polymorphism in maternal LRP8 gene is associated with fetal growth. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 770-777.
- Wang, Y., et Walsh, S. W. (2001). Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta* 22, 206-212.
- Wang, Y., Wang, X., Kong, Y., Zhang, J. H., et Zeng, Q. (2010). The Great Chinese Famine leads to shorter and overweight females in Chongqing Chinese population after 50 years. *Obesity (Silver Spring)* 18, 588-592.
- Waterland, R. A. (2009). Early environmental effects on epigenetic regulation in humans. *Epigenetics* 4, 523-525.
- Waterland, R. A., Dolinoy, D. C., Lin, J.-R., Smith, C. A., Shi, X., et Tahiliani, K. G. (2006). Maternal methyl supplements increase offspring DNA methylation at Axin Fused. *Genesis* 44, 401-406.
- Waterland, R. A., et Garza, C. (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr* 69, 179-197.
- Webster, R. P., Brockman, D., et Myatt, L. (2006). Nitration of p38 MAPK in the placenta: association of nitration with reduced catalytic activity of p38 MAPK in pre-eclampsia. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 677-685.
- Weindruch, R., et Walford, R. L. (1982). Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* 215, 1415-1418.
- Whorwood, C. B., Firth, K. M., Budge, H., et Symonds, M. E. (2001). Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type 1 angiotensin ii receptor in neonatal sheep. *Endocrinology* 142, 2854-2864.
- Wigglesworth, J. S. (1964). Experimental growth retardation in the foetal rat. *J Pathol Bacteriol* 88, 1-13.

- Wilcox, M. A., Smith, S. J., Johnson, I. R., Maynard, P. V., et Chilvers, C. E. (1995). The effect of social deprivation on birthweight, excluding physiological and pathological effects. *Br J Obstet Gynaecol* *102*, 918-924.
- Wilding, J. P., Ajala, M. O., Lambert, P. D., et Bloom, S. R. (1997). Additive effects of lactation and food restriction to increase hypothalamic neuropeptide Y mRNA in rats. *J. Endocrinol* *152*, 365-369.
- Wilson, M. R., et Hughes, S. J. (1997). The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *J. Endocrinol.* *154*, 177-185.
- Y -
- Yajnik, C. S., Fall, C. H., Vaidya, U., Pandit, A. N., Bavdekar, A., Bhat, D. S., Osmond, C., Hales, C. N., et Barker, D. J. (1995). Fetal growth and glucose and insulin metabolism in four-year-old Indian children. *Diabet. Med* *12*, 330-336.
- Yamamoto, M., Sobue, G., Yamamoto, K., Terao, S., et Mitsuma, T. (1996). Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem. Res* *21*, 929-938.
- Yamamoto, T., Habata, Y., Matsumoto, Y., Yasuhara, Y., Hashimoto, T., Hamajyo, H., Anayama, H., Fujii, R., Fuse, H., Shintani, Y., *et al.* (2011). Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* *1810*, 853-862.
- Yamanaka, M., Itakura, Y., Tsuchida, A., Nakagawa, T., Noguchi, H., et Taiji, M. (2007a). Comparison of the antidiabetic effects of brain-derived neurotrophic factor and thiazolidinediones in obese diabetic mice. *Diabetes Obes Metab* *9*, 879-888.
- Yamanaka, M., Tsuchida, A., Nakagawa, T., Nonomura, T., Ono-Kishino, M., Sugaru, E., Noguchi, H., et Taiji, M. (2007b). Brain-derived neurotrophic factor enhances glucose utilization in peripheral tissues of diabetic mice. *Diabetes Obes Metab* *9*, 59-64.
- Yamashita, H., Shao, J., et Friedman, J. E. (2000). Physiologic and molecular alterations in carbohydrate metabolism during pregnancy and gestational diabetes mellitus. *Clin Obstet Gynecol* *43*, 87-98.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., *et al.* (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med* *7*, 941-946.
- Yiallourides, M., Sebert, S. P., Wilson, V., Sharkey, D., Rhind, S. M., Symonds, M. E., et Budge, H. (2009). The differential effects of the timing of maternal nutrient restriction in the ovine placenta on glucocorticoid sensitivity, uncoupling protein 2, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and cell proliferation. *Reproduction* *138*, 601-608.

Yue, P., Jin, H., Xu, S., Aillaud, M., Deng, A. C., Azuma, J., Kundu, R. K., Reaven, G. M., Quertermous, T., et Tsao, P. S. (2011). Apelin decreases lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology* 152, 59-68.

- Z -

Zacchigna, S., Lambrechts, D., et Carmeliet, P. (2008). Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci* 9, 169-181.

Zhu, S., Sun, F., Li, W., Cao, Y., Wang, C., Wang, Y., Liang, D., Zhang, R., Zhang, S., Wang, H., *et al.* (2011). Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biochem* 353, 305-313.

Zou, M. X., Liu, H. Y., Haraguchi, Y., Soda, Y., Tatemoto, K., et Hoshino, H. (2000). Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS Lett* 473, 15-18.

Retard de croissance intra-utérin et vulnérabilité au syndrome métabolique : recherche de marqueurs placentaires dans un modèle de dénutrition maternelle prénatale et évaluation clinique

De nombreuses données indiquent qu'un petit poids à la naissance, résultant en partie d'une sous-nutrition materno-fœtale, est associé à une augmentation de la morbidité et de la mortalité durant la période néonatale, et conduit également à un risque accru de développer à l'âge adulte un syndrome métabolique (diabète de type 2, obésité, hypertension artérielle et dyslipidémie). Les mécanismes de cette programmation prénatale sont encore mal connus et impliqueraient plusieurs molécules et systèmes physiologiques distincts. De nombreuses études suggèrent que le placenta serait impliqué dans la programmation de ces pathologies métaboliques. En effet, celui-ci constitue un organe de communication entre la mère et son fœtus et participe à la régulation de l'homéostasie fœtale. En raison de la proportion croissante de femmes présentant des troubles de la nutrition durant la grossesse et en lien avec leurs répercussions potentielles chez la descendance, il est nécessaire de mieux comprendre les interactions entre l'alimentation maternelle et l'unité fœto-placentaire et d'identifier les mécanismes impliqués dans les altérations de la croissance fœtale. En conséquent, le placenta constitue un organe de choix pour étudier les interactions entre l'alimentation maternelle et le fœtus au cours de la grossesse. Durant cette thèse, nous avons tenté d'identifier de nouvelles voies moléculaires placentaires impliquées dans le contrôle de la croissance fœtale chez le rat, puis d'étudier l'expression de ces facteurs dans des placentas humains provenant de grossesses impliquant des anomalies de la croissance fœtale.

Comme la malnutrition maternelle constitue une part importante dans l'étiologie de la restriction de croissance intra-utérine (RCIU), nous avons utilisé un modèle expérimental effectué chez le rat, qui consiste en une réduction (de 50 % à 70 %) de la ration alimentaire quotidienne maternelle durant la gestation. Ces régimes conduisent à des troubles de la croissance de l'unité fœto-placentaire révélés par des réductions drastiques du poids du placenta et des poids de naissance à terme. Afin d'identifier de nouvelles voies placentaires impliquées dans RCIU, nous avons utilisé deux méthodologies différentes : une approche protéomique et une évaluation de deux protéines récemment caractérisées.

Premièrement, nous avons étudié le protéome placentaire chez le rat RCIU provenant de mères dénutries par une analyse protéomique (2D-PAGE et spectrométrie de masse). Cette stratégie nous a permis de découvrir de nouvelles voies modulées par le RCIU et, étonnamment, des modulations importantes ont été observées pour plusieurs protéines mitochondriales, suggérant un effet ciblé de la dénutrition sur ces organites. Par la suite, en utilisant diverses techniques d'analyses moléculaires, protéomiques et fonctionnelles, nous avons montré que ces organites élaborent une réponse adaptative à la restriction alimentaire maternelle qui pourrait avoir des conséquences sur la régulation de la croissance fœtale. Deuxièmement, nous avons étudié deux autres protéines atypiques : le *brain-derived neurotrophic factor* et l'hormone apéline. Nos résultats suggèrent que ces deux facteurs pourraient être impliqués, au niveau placentaire, dans le contrôle de la croissance fœtale à la fois chez le rat et chez l'Homme.

En conclusion, comme les techniques cliniques actuelles ne permettent pas de diagnostiquer avec précision un RCIU, nos résultats pourraient permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie placentaire et permettre de développer de nouveaux marqueurs de diagnostic et/ou de traitement dans le but d'améliorer la croissance placentaire et fœtale en conditions pathologiques.

Intrauterine growth restriction and vulnerability to the metabolic syndrome: Research of placental markers by proteomic analysis in rats and experimental and clinical evaluation

Growing evidences indicate that a small birthweight, resulting from maternal malnutrition or others prenatal alterations, is associated with an increased neonatal morbidity and mortality and may lead to higher propensity to develop a metabolic syndrome (including type 2 diabetes, obesity, hypertension and dyslipidemia) in adulthood. However, the physiopathological mechanisms acting *in utero* on the programming of the offspring's metabolic profile remain confused and may implicate numerous molecules and physiological systems. Several data suggest that the placental alterations may have long-lasting consequences and could thus contribute to the programming of adult metabolic diseases. The placenta is the primary means of communication and nutrient delivery to the fetus and is also involved in fetal homeostasis. Thus, the placenta may constitute an appropriate organ for investigating how differences in maternal food consumption are sensed by the fetus along the pregnancy. Because of the increasing proportion of women eating inadequately during pregnancy and because such nutritional disturbances may have huge repercussions on adult health of the offspring, we urgently have to better understand how the placenta elaborates adaptive responses to maternal food intake modulations. My PhD aimed at identifying new placental pathways implicated in fetal growth restriction in rat, and investigated in human placental samples, the expression of these factors in pregnancies with fetal growth disturbances.

As maternal malnutrition constitutes an important part in the etiology of intrauterine growth restriction (IUGR), we used an experimental model performed in rats which consists of a reduction (from 50% to 70%) of the daily maternal food intake during the gestation. These regimens lead to profound growth disturbances of the feto-placental unit revealed by drastic reductions of both placental and birth weights at term. To identify new placental pathways implicated in IUGR, we have used two different strategies: a proteomic approach and the evaluation of two proteins recently characterized in the placenta.

First, we investigated the placental proteome in IUGR rats from undernourished mothers using 2D-PAGE electrophoresis and mass spectrometry identification. This strategy allowed the discovery of new pathways modulated by IUGR. Surprisingly, major modulations were observed for several proteins localized in mitochondria, suggesting specific effects of maternal undernutrition on these organelles. Thereafter, using multiple molecular, proteomic and functional analyses, we have shown that these organelles develop adaptive responses to maternal nutrient restriction that may have functional consequences on the regulation of the fetal growth. Secondly, we studied two others atypical proteins: the brain-derived neurotrophic factor and the hormone apelin. Our findings suggest that both of these factors may be implicated in the control of fetal growth at the placental level in rat and putatively in human. As actual clinical methods do not permit to diagnose precisely fetal growth disturbances, our results may permit to better understand the placental physiological pathways implicated during these pathologies and could lead to the development of markers and/or treatments in order to improve both placental functions and fetal growth.