



HAL
open science

Altération de la croissance fœtale et programmation métabolique : étude de l'implication des Rho-kinases et du système apelinergique chez les rongeurs

Laura Butruille

► **To cite this version:**

Laura Butruille. Altération de la croissance fœtale et programmation métabolique : étude de l'implication des Rho-kinases et du système apelinergique chez les rongeurs. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. <NNT : 2013LIL2S015>. <tel-00979470>

HAL Id: tel-00979470

<https://theses.hal.science/tel-00979470v1>

Submitted on 16 Apr 2014

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.



HAL Authorization

Université Droit et Santé de Lille 2

Ecole doctorale Biologie-Santé

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2

Discipline : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Laura BUTRUILLE

le 26 Septembre 2013

**ALTERATION DE LA CROISSANCE FOETALE ET
PROGRAMMATION METABOLIQUE : ETUDE DE
L'IMPLICATION DES RHO-KINASES ET DU SYSTEME
APELINERGIQUE CHEZ LES RONGEURS**

Professeur Laurent STORME

Docteur Bertrand BLONDEAU

Docteur Robert DUCROC

Docteur Claude KNAUF

Professeur Philippe DERUELLE

Professeur Jean LESAGE

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Unité de recherche : *Environnement Périnatal et Croissance (EA 4489)*

Faculté de Médecine Pôle Recherche, Lille

RÉSUMÉ

Durant ces dernières années, de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence que les pathologies métaboliques (obésité, diabète) et cardiovasculaires pourraient, en partie, se déterminer dès la grossesse, via des perturbations de l'environnement intra-utérin. La notion de « programmation foetale » implique qu'une altération durant la vie foetale perturberait le développement du fœtus et le vulnérabiliserait au développement ultérieur de pathologies. Ainsi, un enfant qui naît avec un très faible poids de naissance (inférieur à 2,5 kg) ou à l'inverse avec un poids de naissance très élevé (supérieur à 4,0 kg) est statistiquement plus vulnérable au développement de ces maladies. Pour étudier ce phénomène et tenter d'en comprendre les mécanismes, nous avons utilisé des modèles expérimentaux (rat, souris) et évalué l'action et l'expression de deux substances vasodilatatrices : le Fasudil (un inhibiteur des Rho-kinases) et l'hormone apeline.

Les rates gestantes traitées par le L-NAME, un inhibiteur de la NO synthase (50 mg/jour) présentaient une hypertension artérielle et leurs nouveau-nés un retard de croissance intra-utérin (RCIU) de l'ordre de 20%. L'administration aux mères de Fasudil (10 mg/jour) permettait de restaurer une pression artérielle normale en fin de gestation et améliorait considérablement la croissance foetale des animaux exposés au L-NAME. Cependant, alors que les animaux nés avec un RCIU (nouveau-nés L-NAME) ne présentaient que peu de perturbations métaboliques à l'âge adulte, les animaux exposés au Fasudil seul étaient rapidement en surpoids, présentaient une hyperglycémie à jeun et développaient des troubles du comportement alimentaire de type hyperphagique. D'autre part, par une étude menée chez des souris obèses et intolérantes au glucose après exposition à un régime hyperlipidique, nous avons démontré que l'expression génique de l'apeline est altérée dans plusieurs organes (foie, rein, tissu adipeux) bien que l'apelinémie des souris obèses reste inchangée. Des études en voie de finalisation sont menées afin de déterminer si le système apelinergique est modulé chez des souris gestantes obèses à la fois dans les compartiments maternels et foetaux mais aussi dans le placenta.

En conclusion, nous avons démontré que l'inhibition de la voie des Rho-kinases en fin de gestation programme chez la descendance un surpoids, une hyperglycémie et une altération de la prise alimentaire. Ayant démontré que le système apelinergique est altéré chez des souris femelles obèses et intolérantes au glucose, il nous reste à déterminer si ce système est aussi perturbé en condition de grossesse associée à l'obésité maternelle.

Mots-clés : programmation foetale, RCIU, Fasudil, apeline, rat, souris

ABSTRACT

Intrauterine growth disturbance and metabolic programming: implication of the Rho-kinase pathway and the apelinergic system in rodents

During the last decade, many epidemiological studies have shown that adult chronic metabolic (obesity, diabetes) and cardiovascular diseases may be determined, at least in part, during pregnancy through alterations of intrauterine environment. The “fetal programming” hypothesis implies that disturbances of the fetal development (intra uterine growth restriction - IUGR - or macrosomia) increase the vulnerability to develop these pathologies in adulthood.

To gain more insight into the mechanisms implicated in fetal programming, we used two experimental models of rodents (rat, mouse) and evaluated first the effect of an inhibition of the Rho-kinase pathway *in utero* on fetal growth and postnatal development in rats. In another study performed in mice, we aimed to assess the expression of apelin and its receptor APJ in obese and glucose intolerant mice fed with a high fat diet. Using data of this preliminary study, we speculated that this signaling system may be targeted during the pregnancy of obese mothers and could be implicated into the physiopathological consequences that may affect the fetoplacental unit. We demonstrated that pregnant rats treated by L-NAME, a NO synthase inhibitor (50 mg/day) were hypertensive and that their newborns presented a dramatic IUGR. Maternal treatment with the vasodilator Fasudil (10 mg/day) restored a normal maternal blood pressure and remarkably alleviated the fetal growth of L-NAME newborns. In adults, L-NAME male rats developed mild metabolic pathologies whereas rats exposed *in utero* to Fasudil presented an overweight, with hyperphagia and glucose intolerance. In obese and glucose intolerant mice fed with a high fat diet, we showed that apelin gene expression was altered in several organs (liver, kidney and adipose tissue) without any variation of apelin plasma concentration. Further studies are currently performed in our laboratory to unravel the expression of the apelin/APJ pathway in pregnant obese mice and their offspring.

Keywords: fetal programming, IUGR, Fasudil, apelin, rat, mouse

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

🌀 Articles originaux:

- **Butruille L**, Drougard A, Knauf C, Moitrot E, Valet P, Storme L, Deruelle P, Lesage J. *The apelinergic system: Sexual dimorphism and tissue-specific modulations by obesity and insulin resistance in female mice.* Peptides. 2013 Jun 5.

- Lukaszewski MA, **Butruille L**, Moitrot E, Montel V, Dickes-Coopman A, Lesage J, Laborie C, Vieau D, Breton C. *The hypothalamic POMC mRNA expression is upregulated in prenatally undernourished male rat offspring under high-fat diet.* Peptides. 2013 Mar 20;43C:146-154.

- **Butruille L**, Mayeur S, Moitrot E, Storme L, Knauf C, Lesage J, Deruelle P. *Maternal hypertension induced by NO blockade does not program adult metabolic diseases in growth-restricted rat fetuses.* Metabolism. 2013 Mar;62(3):442-5.

- **Butruille L**, Mayeur S, Duparc T, Knauf C, Moitrot E, Fajardy I, Valet P, Storme L, Deruelle P, Lesage J. *Prenatal Fasudil exposure alleviates fetal growth but programs hyperphagia and overweight in the adult male rat.* European Journal of Pharmacology. 2012 Aug 15;689(1-3):278-84.

- **Butruille L**, Ivars J, Knauf C, Bouckenooghe T, Mayeur S, Vieau D, Valet P, Deruelle P, Lesage J. *Maternal hypertension induces tissue-specific modulations of the apelinergic system in the fetoplacental unit in rat.* Peptides. 2012 May;35(1):136-8.

🌀 Communications orales et affichées:

- **Butruille L**, Moitrot E, Storme L, Deruelle P, Lesage J, *Effets de l'inhibition des Rho-kinases in utero sur la régulation de l'appétit* [Communication affichée], 12^{ème} journée André

Verbert, Lille, 11 Septembre 2012 et [Communication orale], Journée Francophone de Recherche en Néonatalogie, Paris, 13 Décembre 2012

- **Butruille L**, Moitrot E, Fajardy I, Storme L, Deruelle P, Lesage J, *Rho-kinase inhibition during late gestation programs hyperphagia and overweight in adult male rats* [Communication affichée], Société Francophone Origines Développementales de la Santé (SF-DOHaD), Paris, 8 et 9 Novembre 2012

- **Butruille L**, Mayeur S, Moitrot E, Storme L, Lesage J, Deruelle P, *Effects of Rho-kinase pathway inhibition by Fasudil on growth and metabolic parameters in a rat model of intrauterine growth retardation* [Communication affichée], Society for Maternal-Fetal Medicine, Dallas, Etats-Unis, 7 Février 2012

- **Butruille L**, *Effets de l'inhibition des Rho-kinases par le Fasudil sur la croissance et les paramètres métaboliques dans le RCIU* [Communication orale], What's up au Pôle Recherche, Lille, 7 Novembre 2011

- **Butruille L**, Caputo M, Lesage J, Mayeur S, Storme L, Deruelle P, *Effets de l'inhibition des Rho-kinases par le Fasudil sur la croissance et les paramètres métaboliques après retard de croissance intra-utérin* [Communication affichée], Société Francophone du Diabète, Genève, Suisse, 23 Mars 2011 et [Communication orale], Société Française de Médecine Périnatale, Deauville, 13 Octobre 2010

AVANT-PROPOS

C'est au sein de l'unité de recherche EA 4489 « Environnement Périnatal et Croissance » dirigée par le Professeur Laurent STORME que j'ai pu réaliser les travaux qui seront présentés dans cette thèse. Les principaux axes de recherche développés dans notre laboratoire sont d'étudier les conséquences neuro-endocrines, métaboliques et hormonales d'une altération de la croissance périnatale induite par l'environnement (qu'elle soit toxique, douloureuse ou nutritionnelle), de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou environnementales pour prévenir la programmation périnatale des pathologies de l'adulte (notion de « déprogrammation ») et de rechercher des marqueurs prédictifs précoces de conséquences d'une altération de la croissance périnatale liée à l'environnement.

Ainsi, et en lien avec l'orientation thématique du laboratoire, ce projet de recherche visait à avoir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'altération de la croissance fœtale via l'insuffisance placentaire ou l'obésité et la programmation d'un syndrome métabolique chez la descendance. De plus, nous avons recherché un traitement pour tenter de « déprogrammer » chez le rongeur la survenue ultérieure de pathologies de l'adulte.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Implantation du blastocyste

Figure 2 : Représentation schématique d'un placenta humain au 4^{ème} mois de grossesse

Figure 3 : Le fœtus humain et son placenta

Figure 4 : Représentation schématique d'un placenta humain

Figure 5 : Remodelage des artères utérines lors d'une placentation normale ou anormale

Figure 6 : Répartition de la population française en fonction de l'IMC en 2012

Figure 7 : Prévalence de l'obésité en France en fonction du sexe et de l'âge

Figure 8 : Représentation graphique de la prévalence de l'obésité dans le monde et en Europe

Figure 9 : Effets de l'inflammation sur le pancréas, le tissu adipeux et le muscle squelettique

Figure 10 : Conséquences de l'obésité maternelle sur le développement du placenta et du fœtus

Figure 11 : Synthèse du monoxyde d'azote (NO)

Figure 12 : Séquence en acides aminés des différentes isoformes de l'apeline

Figure 13 : Voies de signalisation impliquées dans l'utilisation du glucose par le muscle induite par l'apeline

Figure 14 : Voies de signalisation responsables de la vasodilatation/vasoconstriction en réponse à l'apeline

Figure 15 : Vue d'ensemble des principales actions de l'apeline

Figure 16 : Régulation de l'expression des gènes par des processus épigénétiques

Figure 17 : Représentation graphique des risques d'apparition de pathologies métaboliques en fonction du poids de naissance

Figure 18 : Représentation schématique de la régulation de la contraction des muscles lisses et des vaisseaux par la voie des Rho-kinases et le Fasudil

Figure 19 : Concentration en leptine plasmatique

Figure 20 : Expressions hypothalamiques des gènes NPY, POMC, AgRP, CART et des récepteurs à l'insuline (InsR) et à la leptine (LepR)

Figure 21 : Poids, glycémie, insulinémie et HOMA-IR des souris témoins en bleu et High Fat en orange

Figure 22 : Prise alimentaire moyenne par souris en phase diurne, en phase nocturne et sur 24 heures après 3 mois de régime hypercalorique

Figure 23 : Dosages hormonaux hors-gestation, à 6,5 jours de gestation, à 12,5 jours de gestation et au terme à 18,5 jours de gestation chez les souris témoins et sous régime « *High Fat* » après 6 heures de jeûne

Figure 24 : Paramètres morphologiques des souriceaux à 18,5 jours de gestation

Figure 25 : Courbes de croissance en fonction de l'âge gestationnel

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Evolution de l'indice de masse corporelle moyen chez les hommes et les femmes entre 1980 et 2008 en France, aux Etats-Unis et en Angleterre

Tableau 2 : Recommandations de l'Institut de Médecine sur le gain de poids total en fonction de l'indice de masse corporelle préconceptionnel

Tableau 3 : Déterminants de la croissance foetale

Tableau 4 : Masse des organes maternels

Tableau 5 : Paramètres biologiques et morphologiques maternels et foetaux à E18,5

ABRÉVIATIONS

ACE 2 : *Angiotensin-Converting Enzyme 2*

ACTH : hormone corticotrope

ADMA : diméthylarginine asymétrique

ADN : acide désoxyribonucléique

AGA : *Appropriate for Gestational Age*

AgRP : *Agouti-Related Peptide*

AMPK : protéine kinase activée par l'AMP

APJ : récepteur de l'apeline

APKO : souris génétiquement déficientes en apeline, « KO » pour *Knock Out*

ARN : acide ribonucléique

AVP : arginine vasopressine, hormone anti-diurétique

CART : *Cocaine and Amphetamine Related Transcript*

CGRP : *Calcitonin Gene-Related Peptide*

CHO : lignée cellulaire, « CHO » pour *Chinese Hamster Ovary*

CRP : protéine C réactive

Da : dalton

DAG : diacylglycérol

db /db : souris génétiquement déficientes en récepteur de la leptine, « db » pour diabète.

DOHaD : Origines développementales de la santé et des maladies

E1, E6, E12,5... : Jour de gestation, « E » pour stade embryonnaire

eNOS : NO synthase endothéliale

FAD : flavine adénine dinucléotide

FATP : transporteur des acides gras

FTO : gène de susceptibilité à l'obésité, « FTO » pour *Fat mass and Obesity associated*

GC : guanylate cyclase
GDP : guanosine diphosphate
GH : hormone de croissance
Gi : protéine G inhibitrice
GLUT : transporteur du glucose
GMPc : guanosine monophosphate cyclique
Gq : protéine Gq
GTP : guanosine triphosphate
GTPase : enzyme qui hydrolyse le GTP
HbA1c : hémoglobine glyquée
hCG : hormone chorionique gonadotrophe humaine
HDL : *High Density Lipoprotein*
HF : hypercalorique, « HF » pour *High Fat*
HOMA-IR : *Homeostasis Model of Assessment-Insulin Resistance*
i.c.v : injection intracérébroventriculaire.
IGF : *Insulin-like Growth Factor*
IMC : indice de masse corporelle
iNOS : NO synthase inductible
InsR : récepteur de l'insuline
IP3 : inositol-3,4,5-phosphate
IRS : *Insulin Receptor Substrate*
IUGR : *Intrauterine Growth Retardation*
KO : *Knock Out*
L-Arg : L-Arginine
LepR : récepteur de la leptine
LGA : *Large for Gestational Age*

L-NAME : -N- ω -nitro-L-Arginine méthylester
L-NMMA : N- ω -monométhylarginine
MIA : méthylisobutyl amirolide
MLC : chaîne légère de myosine
MLCK : kinase des chaînes légères de myosine
MLCP : phosphatase des chaînes légères de myosine
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF κ B : *Nuclear Factor-kappa B*
nNOS : NO synthase neuronale
NO : monoxyde d'azote
NPY : neuropeptide Y
ob/ob : souris génétiquement déficientes en leptine, « ob » pour obèse
OLETF : souche de rat, « OLETF » pour *Otsuka Long Evans Tokushima Fatty*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P7, P14 : âge en jours, « P » pour *Postnatal day*
PE : prééclampsie
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PLC : phospholipase C
POMC : proopiomélanocortine
PTX : toxine pertussique
PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
RCIU : retard de croissance intra-utérin
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
ROCK : Rho-kinase
Ser : résidu sérine

SEM : écart standard à la moyenne

SGA : *Small for Gestational Age*

SHR : souche de rats hypertendus, « SHR » pour *Spontaneously Hypertensive*

SI-ARN : ARN interférent

SGLT-1 : transporteur du glucose sodium-dépendant de type 1

SNAT : transporteur sodium-dépendant des acides aminés neutres

SON : noyau supraoptique de l'hypothalamus

TLR : Toll-Like Récepteur

TNF α : *Tumor Necrosis Factor alpha*

UCP : protéine découplante

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

α -MSH : *alpha-Melanocyte Stimulating Hormone*

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	21
1. LA GROSSESSE NORMALE.....	22
1.1. DE LA FECONDATION AU FŒTUS	22
1.1.1. <i>La période embryonnaire.....</i>	22
1.1.2. <i>La période fœtale.....</i>	23
1.2. ADAPTATIONS PHYSIOLOGIQUES AU COURS DE LA GROSSESSE	23
1.2.1. <i>Adaptations physiques.....</i>	23
1.2.2. <i>Adaptations hémodynamiques et hormonales.....</i>	23
1.3. ROLE DU PLACENTA.....	24
1.3.1 <i>Structure du placenta</i>	24
1.3.2. <i>L'invasion trophoblastique</i>	27
1.3.3 <i>Le transport des nutriments</i>	28
2. LA GROSSESSE PATHOLOGIQUE	28
2.1. LE CAS DE L'INSUFFISANCE PLACENTAIRE	28
2.1.1. <i>La prééclampsie.....</i>	28
2.1.2. <i>La voie des Rho-kinases.....</i>	29
2.2. LE CAS DE L'OBESITE	30
2.2.1. <i>Définition de l'obésité</i>	30
2.2.2. <i>Risques au cours de la grossesse.....</i>	33
2.2.3. <i>L'inflammation.....</i>	35
3. LES TROUBLES DE LA CROISSANCE FŒTALE	38
3.1. LE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTERIN	40
3.1.1. <i>Définition</i>	40
3.1.2. <i>Etiologie</i>	40
3.1.3. <i>Mécanismes possibles.....</i>	41
3.1.3.1 <i>La voie du monoxyde d'azote.....</i>	41
3.1.3.2. <i>Monoxyde d'azote et croissance.....</i>	42
3.2. LA MACROSOMIE	43
3.2.1. <i>Définition</i>	43
3.2.2. <i>Etiologie</i>	43
3.2.3. <i>Mécanismes possibles.....</i>	44
3.2.3.1. <i>Une adipokine cible : l'apeline.....</i>	44
3.2.3.1.1. <i>Biosynthèse et dégradation.....</i>	45
3.2.3.1.2. <i>APJ : récepteur ubiquitaire.....</i>	46
a) <i>Localisation</i>	46

b) Action paracrine / autocrine.....	46
c) Internalisation.....	46
d) Les voies de signalisation.....	47
3.2.3.1.3. La régulation du métabolisme glucidique par l'apeline.....	49
3.2.3.1.4. L'apeline : rôle dans l'obésité.....	50
3.2.3.1.5. Les différentes fonctions du système apelinergique dans l'organisme.....	51
a) Action centrale.....	51
• La modulation de l'équilibre hydrique.....	51
• La régulation de la prise alimentaire.....	52
b) Effets cardiovasculaires.....	52
• La vasodilatation.....	52
• La contractilité cardiaque.....	54
• L'angiogénèse.....	54
c) Autres effets.....	55
• La relaxation musculaire.....	55
• L'absorption du glucose intestinal.....	56

4. LA PROGRAMMATION FŒTALE57

4.1. L'HYPOTHESE DU PHENOTYPE ECONOME.....	57
4.2. LA THEORIE DU « MISMATCH » ENVIRONNEMENTAL.....	58
4.3. L'EFFET DU « CATCH-UP ».....	58
4.4. LES MECANISMES DE PROGRAMMATION FŒTALE.....	59
4.5. FACTEURS EPIGENETIQUES.....	60

5. RETARD DE CROISSANCE & MACROSOMIE62

6. OBJECTIFS DE LA THÈSE.....63

RÉSULTATS66

1. MODÈLE ANIMAL AVEC RCIU & TRAITEMENT PAR FASUDIL.....67

1.1. OBJECTIFS.....	67
1.2. MODELE ANIMAL D'INSUFFISANCE PLACENTAIRE INDUIT PAR UNE INHIBITION DES NO SYNTHASES.....	67
1.2.1. L-NAME et gestation.....	67
1.2.1.1. L'inhibition compétitive.....	67
1.2.1.2. Les observations cliniques.....	68
1.2.1.3. Les modifications métaboliques.....	69
1.3. EFFET A COURT ET A LONG TERME.....	70
Article n°1: "Maternal hypertension induced by NO blockade does not program adult metabolic diseases in growth-restricted rat fetuses", <i>Metabolism</i> , 2012.....	71

1.4. TENTATIVE DE DEPROGRAMMATION.....	74
<i>Article n°2: “Prenatal Fasudil exposure alleviates fetal growth but programs hyperphagia and overweight in the adult male rat” European Journal of Pharmacology, 2012.....</i>	77
2. MODELE ANIMAL D’OBESITE	83
2.1. OBJECTIFS	83
2.2. INTRODUCTION SUR LES MODELES MURINS D’OBESITE	83
2.2.1. <i>Les modèles génétiques.....</i>	83
2.2.2. <i>Le régime hypercalorique.....</i>	84
<i>Article n°3: “The apelinergic system: Sexual dimorphism and tissue-specific modulations by obesity and insulin resistance in female mice” Peptides, 2013.....</i>	86
2.4. SOURIS OBESES, APELINE ET GESTATION	88
2.4.1. <i>L’évolution de l’apelinémie au cours de la gestation.....</i>	88
2.4.2. <i>Résultats.....</i>	89
2.4.2.1. Introduction.....	89
2.4.2.2. Matériel et Méthodes	90
2.4.2.3. Résultats préliminaires.....	91
2.4.2.3.1. Souris obèses et intolérantes au glucose.....	91
2.4.2.3.2. Paramètres morphologiques maternels	93
2.4.2.3.3. Paramètres maternels et fœtaux.....	95
2.4.2.4. Discussion.....	97
CONCLUSION & PERSPECTIVES	101
1. PERSPECTIVES.....	102
1.1. LE MODELE L-NAME.....	102
1.1.1. <i>Paramètres métaboliques : utilisation d’un régime hypercalorique ?.....</i>	102
1.1.2. <i>Système apelinergique dans l’unité fœto-placentaire.....</i>	103
1.2. LE FASUDIL (VOIE DES RHO-KINASES) : ROLE DANS LA MACROSOMIE ?	103
1.3. L’APELINE : IMPLICATION PENDANT LA GROSSESSE ?	104
2. CONCLUSION GÉNÉRALE	106
ANNEXES	108
<i>Article n°4: “Maternal hypertension induces tissue-specific modulations of the apelinergic system in the fetoplacental unit in rat.” Peptides, 2012.....</i>	110
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112

INTRODUCTION

1. LA GROSSESSE NORMALE

1.1. De la fécondation au fœtus

1.1.1. La période embryonnaire

Lorsque l'ovocyte maternel et le spermatozoïde paternel fusionnent, on parle de fécondation. De nombreuses réactions vont alors s'opérer pour mener à un embryon viable qui sera prêt à s'implanter dans la paroi utérine de la mère. Il passera par les stades de zygote, morula à blastocyste avant de s'apposer à l'endomètre (paroi interne de l'utérus). Pour une implantation réussie, l'utérus doit être dans un état de « réceptivité » suffisant, cette période apparaît chez l'Homme entre le 20^{ème} et le 24^{ème} jour du cycle menstruel, soit 6 à 10 jours après l'ovulation [1]. L'implantation se déroule en 3 phases : l'apposition, qui correspond à une adhésion instable entre le blastocyste et la surface endométriale, l'adhésion, qui correspond à l'association entre le trophoblaste et l'épithélium luminal puis la pénétration. C'est alors que le tissu trophoblastique se subdivise en deux populations : le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste. Ce dernier possède des propriétés invasives dans le but d'établir une relation avec les vaisseaux maternels (Figure 1) [1-3].

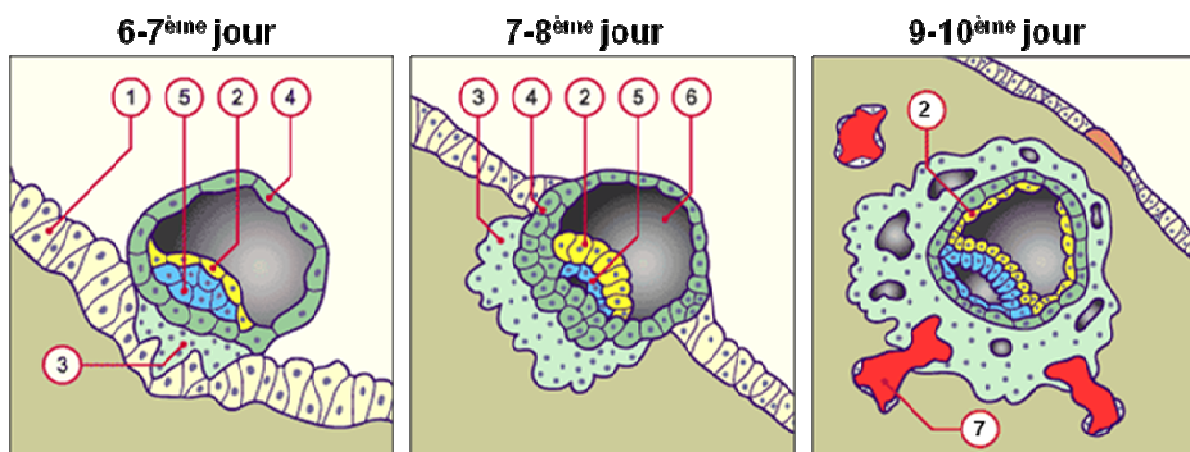


Figure 1: Implantation du blastocyste. 1. Epithélium de la muqueuse utérine, 2. Hypoblaste, 3. Syncytiotrophoblaste, 4. Cytotrophoblaste, 5. Epiblaste, 6. Blastocèle, 7. Erosion des capillaires maternels (<http://www.embryology.ch/francais/gnidation/etape03.html>).

La période embryonnaire dure de la fécondation à la 8^{ème} semaine de gestation, c'est au cours de cette période que l'embryon se développe et que l'organogénèse se produit. Une classification existe pour identifier les stades de développement embryonnaire également appelés : stades de Carnégie [4].

1.1.2. La période fœtale

Après la 8^{ème} semaine, l'embryon devient fœtus et subira une croissance en taille jusqu'à la 39^{ème} semaine de grossesse (fin de la grossesse) qui permettra la maturation et la spécialisation de ses organes [5].

1.2. Adaptations physiologiques au cours de la grossesse

Dès le début de la grossesse, de nombreuses adaptations physiologiques ont lieu chez la mère afin de créer un environnement favorable à l'implantation de l'embryon. Les modifications au cours de la grossesse ont pour but un développement et une croissance correcte du fœtus, une adaptation de la mère à l'état gravidique et une préparation de la mère à l'accouchement.

1.2.1. Adaptations physiques

En plus des changements morphologiques notables, la grossesse s'accompagne d'une prise de poids. Elle comprend le poids du fœtus (entre 2,5 et 4 kg à la naissance), le poids du placenta, le liquide amniotique mais aussi une accumulation de graisses [6].

1.2.2. Adaptations hémodynamiques et hormonales

Le système urinaire est stimulé, la filtration glomérulaire est accrue et les reins produisent plus d'urine pour éliminer les déchets du fœtus. La fréquence respiratoire s'accélère, et le système digestif est ralenti [5].

Le volume d'eau corporelle augmente, vers la 32^{ème} semaine de grossesse le volume sanguin total subit une hausse d'environ 25 à 40%. Le débit cardiaque augmente mais la pression artérielle diminue grâce à la chute des résistances vasculaires en périphérie [7].

Pendant la grossesse, les concentrations plasmatiques des hormones thyroïdiennes ou sexuelles varient et la concentration en ocytocine augmente progressivement. L'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) est une glycoprotéine qui est produite par le trophoblaste pour maintenir le corps jaune. Sa sécrétion permet la production de progestérone qui a pour rôle de maintenir l'utérus à un état quiescent [8]. Les concentrations en β -hCG passent de 0 à 26300 mUI à la 36^{ème} semaine de grossesse. Les concentrations en œstradiol (x 250), en progestérone (x 1000) et en prolactine (x 15) augmentent fortement entre le moment de la conception et la 36^{ème} semaine de grossesse [7]. Les concentrations lipidiques comme les triglycérides et le cholestérol augmentent (x 2 à 3 fois pour les triglycérides pendant la grossesse). En revanche, la glycémie diminue, et la sécrétion d'insuline augmente. Globalement, pendant la grossesse le métabolisme basal est augmenté (de 15 à 30 %).

1.3. Rôle du placenta

1.3.1 Structure du placenta

Le placenta est un organe transitoire, il est programmé pour exister 9 mois et sert de zone d'échanges entre la mère et le fœtus. Il est constitué d'un ensemble de tissus maternels et fœtaux (Figure 2). Dès la 3^{ème} semaine de grossesse, le placenta peut assurer ses fonctions, il apporte des nutriments et de l'oxygène dans le sang fœtal et élimine les déchets circulants fœtaux. C'est à la fin du 2^{ème} mois de grossesse qu'il devient un organe endocrinien et qu'il produit des œstrogènes, de la progestérone et de nombreuses autres hormones [5]. Chez l'Homme, comme chez la plupart des Mammifères le placenta est hémochorial, c'est-à-dire que les villosités placentaires baignent dans le sang maternel de la chambre intervillieuse. Le terme « hémochorial » correspond aux structures maternelles et fœtales qui sont juxtaposées (le chorion et le sang maternel) [9]. Il est en contact avec la muqueuse utérine et est rattaché au fœtus par le cordon ombilical (Figure 2).

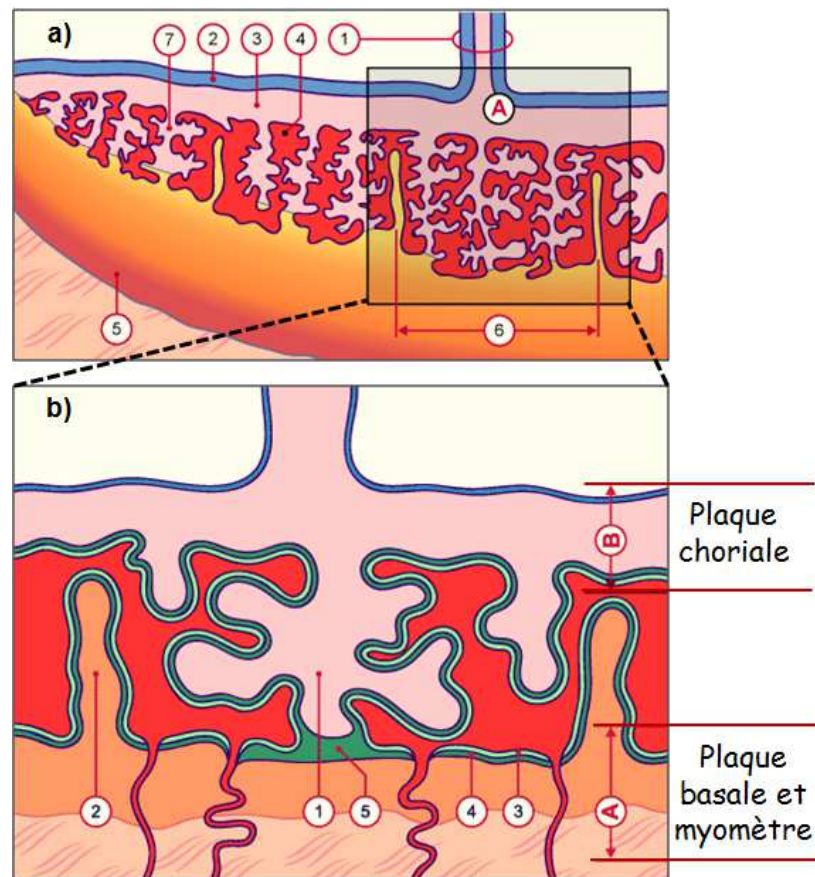


Figure 2: Représentation schématique d'un placenta humain au 4^{ème} mois de grossesse.
a) 1. Cordon ombilical, 2. Amnios, 3. Plaque chorale, 4. Chambre intervillieuse (sang maternel), 5. Plaque basale, 6. Cotylédon, 7. Villosité. *b)* 1. Villosité crampon, 2. Septum, 3. Syncytiotrophoblaste, 4. Cytotrophoblaste, 5. Coque cytotrophoblastique, (<http://www.embryology.ch/francais/fplacenta>)

La partie maternelle du placenta comprend le myomètre, l'endomètre, et les artères spiralées alors que la partie fœtale comprend le trophoblaste endovasculaire (qui a envahi les artères spiralées), le cytotrophoblaste extra-villositaire, le cytotrophoblaste villositaire et le syncytiotrophoblaste. Les villosités trophoblastiques sont établies sous forme de branches, ce qui maximise les surfaces d'échanges avec le sang maternel (Figure 2 et 3) [10].

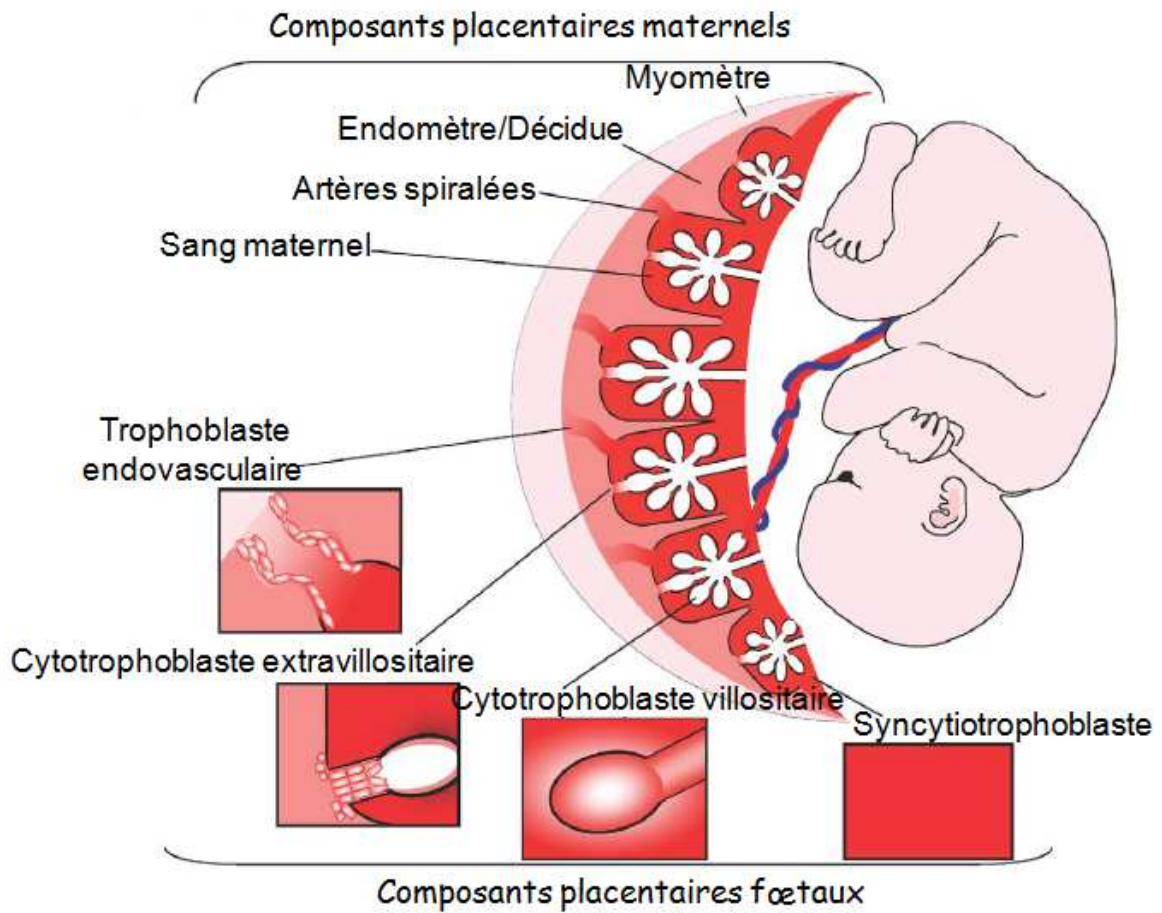


Figure 3: Le fœtus humain et son placenta *d'après Frost et al. 2010.*

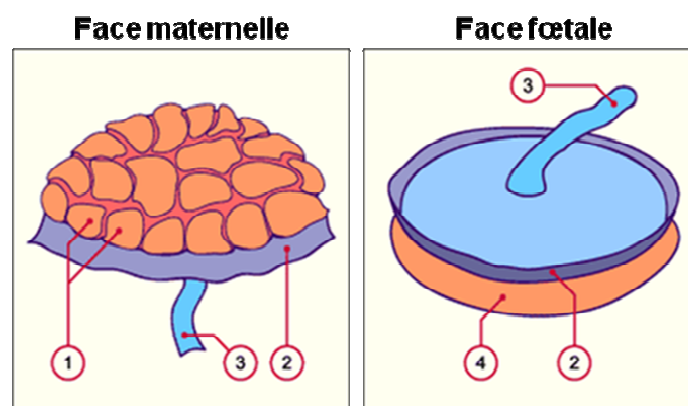


Figure 4: Représentation schématique d'un placenta humain. 1. Cotylédons, 2. Amnios, 3. Cordon ombilical, 4. Caduque (<http://www.embryology.ch/francais/fplacenta>)

1.3.2. L'invasion trophoblastique

L'invasion des tissus maternels par les tissus embryonnaires est une étape indispensable au bon déroulement de la grossesse. Le cytotrophoblaste (placenta embryonnaire) se différencie d'une part en syncytiotrophoblaste qui aura un rôle essentiel dans les échanges foeto-maternels, et d'autre part en cytotrophoblaste extra-villositaire qui colonisera les tissus maternels jusqu'à la 18-20^{ème} semaine de grossesse [11]. Cette invasion trophoblastique entraîne un remodelage profond des artères utérines maternelles. Au cours de leur avancée, les cellules trophoblastiques dégradent localement les cellules musculaires lisses de la media ce qui entraîne un remodelage des artères spiralées. Par la suite, d'autres cellules trophoblastiques envahissent la lumière des vaisseaux maternels et expriment un phénotype de cellule endothéliale en prenant place dans l'endothélium [12;13]. La mise en place de ce nouvel endothélium permet une forte diminution des résistances vasculaires qui a pour conséquence une augmentation du débit sanguin utéro-placentaire (Figure 5A). *In fine*, ces modifications ont pour but d'établir un apport optimal et croissant en oxygène et en nutriments au fœtus [14].

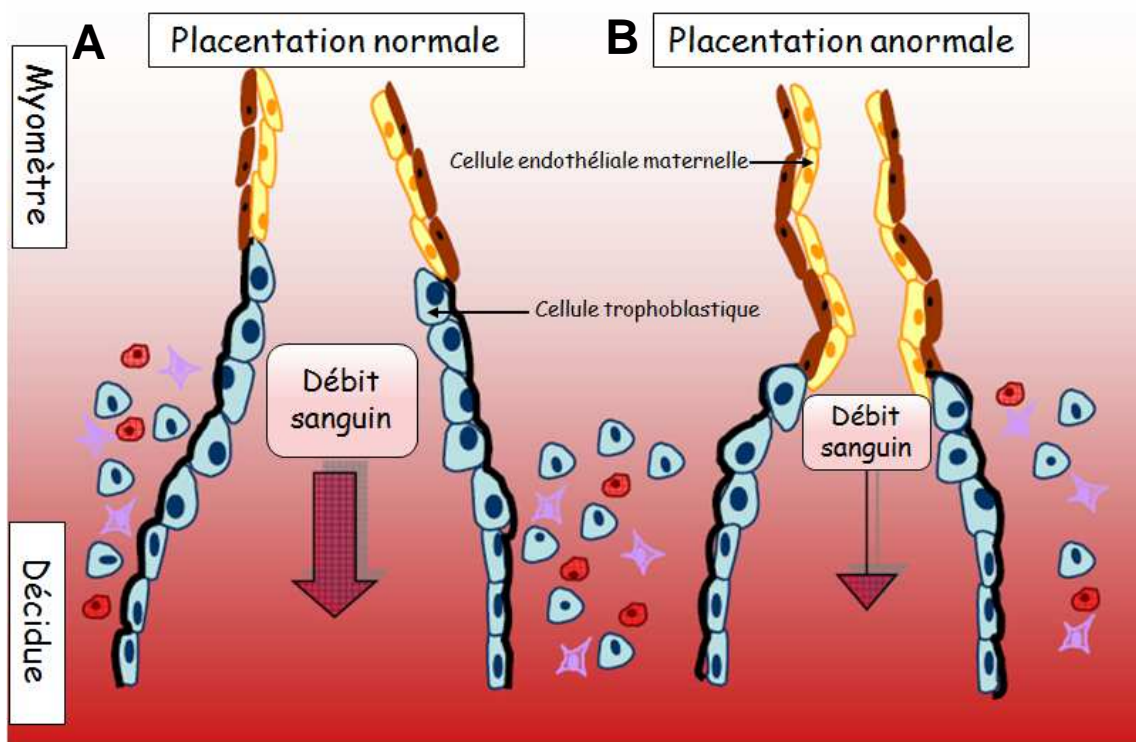


Figure 5: Remodelage des artères utérines lors d'une placentation normale (A) ou anormale (B). Cellules violettes : macrophages ; cellules rouges : Natural Killers (d'après Lunghi et al. 2007)

1.3.3 Le transport des nutriments

Les nutriments passent de la circulation maternelle à la circulation fœtale par les artères utérines, puis les artères spiralées et enfin la chambre intervillieuse. Les échanges mère-fœtus se font à travers le placenta, on parle de barrière hémato-placentaire. Elle est constituée de deux membranes du syncytiotrophoblaste : la membrane microvillositaire du côté maternel et la membrane basale du côté fœtal. A travers cette barrière, la diffusion de certaines molécules peut être simple (c'est le cas pour l'oxygène et le dioxyde de carbone), ou elle peut faire appel à des transporteurs présents sur ces deux membranes placentaires, il y a alors diffusion facilitée (c'est le cas du glucose), ou transport actif (pour les acides aminés, les acides gras et certains ions). Chez l'Homme, le glucose est transporté au fœtus de manière prédominante par le transporteur GLUT 1 et toujours en suivant son gradient de concentration [15;16].

Un grand nombre de substances potentiellement néfastes comme les drogues, l'alcool ou des molécules pharmacologiques peuvent traverser la barrière hémato-placentaire et provoquer des malformations congénitales voire la mort du fœtus [17].

2. LA GROSSESSE PATHOLOGIQUE

2.1. Le cas de l'insuffisance placentaire

2.1.1. La prééclampsie

Dans certains cas pathologiques, un défaut d'invasion trophoblastique peut-être observé. Plutôt que de tapisser les artères spiralées maternelles avec un endothélium à base de cellules trophoblastiques dans la décidue et le myomètre, l'invasion reste peu profonde et n'atteint pas le myomètre [18]. Cela empêche un remodelage adapté des artères spiralées placentaires qui ne se dilatent pas suffisamment et qui restent sous le contrôle vasomoteur maternel (Figure 5B). De hautes résistances vasculaires persistent et par conséquent le débit sanguin utéro-placentaire diminue ; on parle alors d'insuffisance placentaire [12;13]. En clinique, l'insuffisance placentaire est mise en cause lors du développement du syndrome prééclamptique. La prééclampsie (PE) est une pathologie qui affecte environ 5 % des grossesses en France (soit 40 000 cas/an). Elle se caractérise par une hypertension

artérielle gravidique (pression artérielle supérieure à 140/90 mmHg) et une protéinurie (supérieure à 300 mg/24 h) [18]. Dans un tiers des cas, elle s'accompagne d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) pour le fœtus [19]. A ce jour, le seul moyen thérapeutique mis en pratique par les équipes obstétrico-pédiatriques est l'extraction en urgence du fœtus immature et parfois hypotrophe, ce qui augmente le risque de complications maternelles et périnatales (première cause de décès périnataux en France). Les patientes prééclamptiques présenteraient un défaut de relaxation vasculaire endothélium-dépendante (avec une relaxation amoindrie en réponse à l'acétylcholine, [20]).

2.1.2. La voie des Rho-kinases

Des altérations de l'ensemble des mécanismes régulateurs de la vasomotricité utéro-placentaire ont été rapportées dans le développement de la prééclampsie. En effet, sur la base des données actuelles, il résulte que la vasoconstriction jouerait un rôle central dans l'apparition de l'insuffisance placentaire [21;22]. La principale voie de signalisation impliquée dans la vasoconstriction, est la voie moléculaire induite par les variations de concentrations en calcium plasmatique [23]. Lorsque la voie du calcium s'épuise, d'autres voies moléculaires sont mises en jeu telle que la voie des Rho-kinases. Celle-ci implique une enzyme de type GTPase nommée Rho A, et ses effecteurs les Rho kinases 1 et 2 (ROCK 1 et 2) [24]. Des études cliniques ont montré que dans certaines pathologies telles que l'hypertension et la prééclampsie cette famille de protéines était affectée [22]. Les Rho-kinases (ROCK) sont des enzymes qui interviennent principalement dans la régulation du tonus vasculaire. Récemment, une étude menée sur des placentas perfusés de rats a montré que la voie des Rho-kinases contribuait au maintien au repos des résistances vasculaires pendant la gestation mais aussi que cette voie jouait un rôle dans la vasoconstriction fœto-placentaire en cas d'hypoxie [25]. Un inhibiteur de ces kinases, le Fasudil, a été utilisé avec succès pour traiter majoritairement des pathologies impliquant le système cardiovasculaire. Ainsi, dans plusieurs modèles animaux mais aussi chez l'Homme, une amélioration de l'hypertension artérielle pulmonaire a été rapportée ainsi que des effets bénéfiques sur les vasospasmes cérébraux [26-28]. L'utilisation du Fasudil dans un modèle animal d'insuffisance placentaire sera détaillée dans la partie « Résultats » de ce mémoire.

2.2. Le cas de l'obésité

2.2.1. Définition de l'obésité

L'obésité est définie par un excès de masse adipeuse dans l'organisme qui présente un risque pour la santé de l'individu [29]. Le rapport du poids en kilogrammes divisé par la taille en mètre au carré détermine l'indice de masse corporelle (IMC) d'une personne. Un sujet présentant un IMC supérieur à 25 kg/m² est considéré en surpoids alors qu'un IMC supérieur à 30 kg/m² qualifie l'individu d'obèse. Différentes classes d'obésité sont définies : l'obésité de classe I concerne les sujets avec un IMC compris entre 30 et 35 kg/m², l'obésité de classe II correspond à un IMC compris entre 35 et 40 kg/m² et l'obésité de classe III correspond aux sujets avec un IMC supérieur à 40 (Figure 6). L'obésité favorise l'apparition de pathologies comme le diabète, les pathologies cardiovasculaires, les troubles respiratoires ou le cancer [30].

L'obésité est une maladie multifactorielle, elle résulterait en premier lieu d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Le rapport apports/dépenses étant en faveur des apports entraîne un stockage des graisses. La génétique jouerait elle aussi un rôle dans l'établissement de l'obésité en créant une susceptibilité. A ce jour, une trentaine de gènes ont été associés à cette pathologie [31] et le gène FTO (*Fat mass and Obesity associated*) a été le premier locus identifié [32].

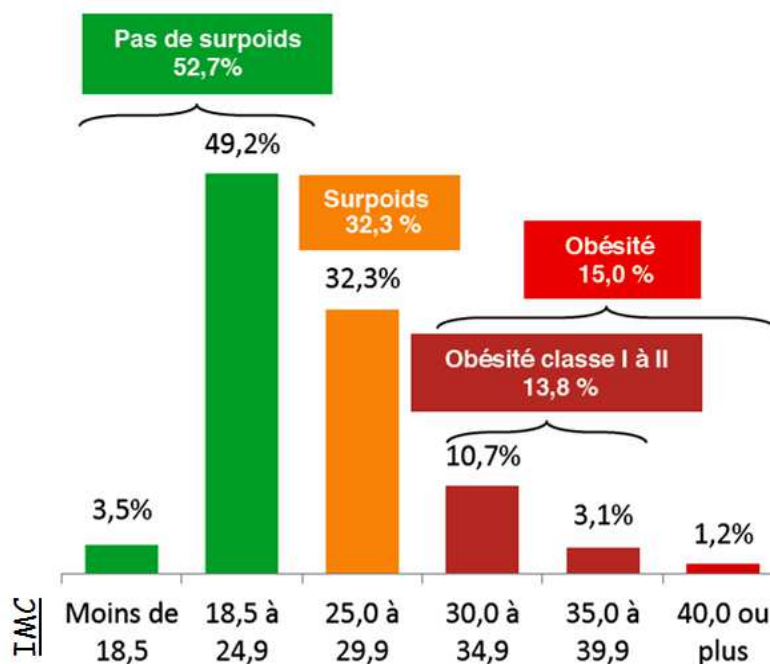


Figure 6: Répartition de la population française en fonction de l'IMC en 2012. *Etude ObÉpi-Roche 2012.*

L'étude ObÉpi a estimé depuis 1997 et jusqu'en 2012 le nombre de résidents français en surpoids ou obèses (étude menée sur un panel de 30 000 personnes environ, représentatif de la population française). En 2012, 32,3% des français âgés de plus de 18 ans étaient en surpoids et 15 % étaient obèses (Figure 6). La prévalence de l'obésité est plus importante chez les femmes (15,7 %) que chez les hommes (14,3%, $P < 0,001$), particulièrement chez les femmes en âge de procréer (Figure 7) [33].

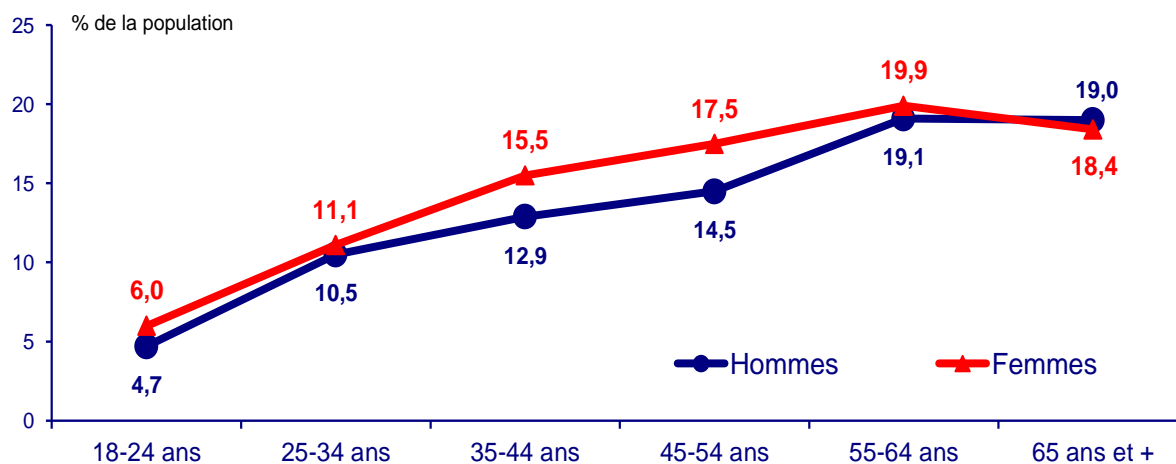


Figure 7: Prévalence de l'obésité en France en fonction du sexe et de l'âge. *Etude ObÉpi-Roche 2012.*

La représentation graphique de la prévalence de l'obésité dans le monde est illustrée par la Figure 8. En 2008, les pays dont les pourcentages de population obèse étaient les plus importants sont : les Etats-Unis (31,8%), le Mexique (32,8%), l'Egypte (34,6%) ou encore l'Afrique du Sud (33,5%). L'obésité est une épidémie grandissante, l'indice de masse corporelle moyen des français a augmenté de 1,2 kg/m² pour les hommes et de 0,7 kg/m² pour les femmes entre 1980 et 2008. Certaines populations montrent une progression encore plus franche : + 3 et + 3,3 kg/m² pour les hommes et les femmes en Amérique du Nord respectivement et +2,7 et + 2,8 kg/m² pour les hommes et les femmes en Angleterre (Tableau 1) [29].

20 ans et +	1980		2008	
	HOMMES	FEMMES	HOMMES	FEMMES
<i>France</i>	24,7	24,1	25,9	24,8
<i>Etats-Unis</i>	25,5	25	28,5	28,3
<i>Angleterre</i>	24,7	24,2	27,4	27

Tableau 1: Evolution de l'indice de masse corporelle moyen chez les hommes et les femmes entre 1980 et 2008 en France, aux Etats-Unis et en Angleterre. *Organisation Mondiale de la Santé (OMS).*

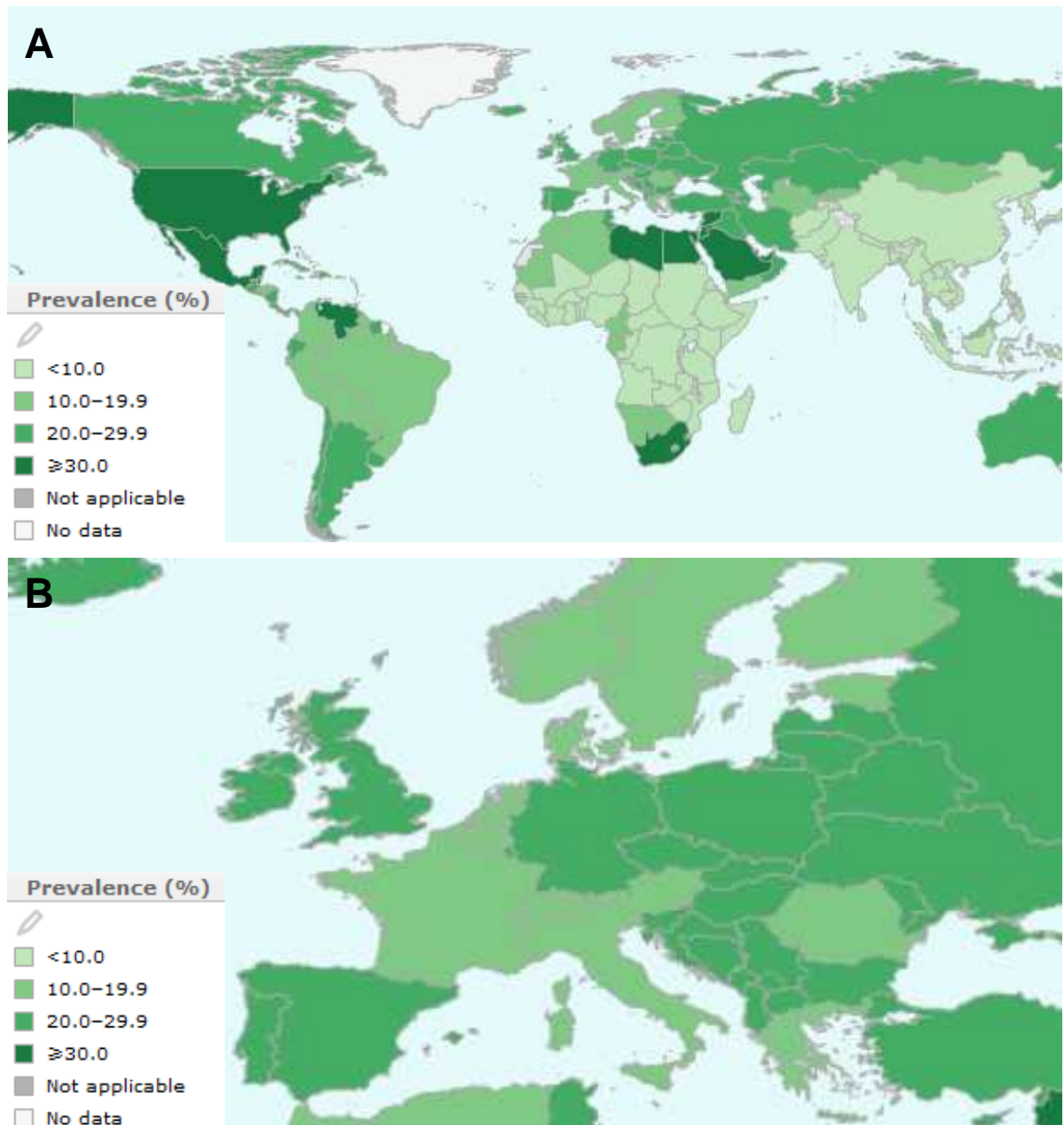


Figure 8: Représentation graphique de la prévalence de l'obésité dans le monde (A) et en Europe (B). *Organisation Mondiale de la Santé.*

[2.2.2. Risques au cours de la grossesse](#)

Les risques de pathologies liées à l'alimentation pendant la grossesse (fromages, légumes, crustacés...) sont bien connus par la population générale, en revanche les méfaits d'une alimentation hypercalorique sont moins bien connus [34]. En 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé estimait à 1,4 milliard le nombre de personnes de plus de 20 ans

atteintes de surpoids et parmi celles-ci 200 millions d'hommes et 300 millions de femmes étaient obèses. En 2011, environ 40 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids. Ces données laissent penser que l'obésité est une épidémie grandissante partout dans le monde y compris pour les femmes en âge de procréer. Cette augmentation de prévalence dans le gain de poids est aussi retrouvée dans le gain de poids au cours de la grossesse [35].

Les complications materno-fœtales associées à l'obésité pendant la grossesse sont corrélées à la valeur de l'indice de masse corporelle préconceptionnel. Les complications les plus retrouvées sont pour le côté maternel : un risque accru d'apparition de diabète gestationnel et d'hypertension et une augmentation de naissances par césariennes. Pour les fœtus exposés, ce sont des risques de macrosomies, et de malformations telles que des anomalies de fermeture du tube neural, des malformations cardiaques et des hernies diaphragmatiques [35].

Les recommandations établies par l'Institut de Médecine sont présentées dans le Tableau 2. Elles impliquent une prise de poids limitée à 9 kg pour les femmes obèses, à 11,5 kg pour les femmes en surpoids et à 16 kg pour les femmes ayant un poids dans les normes. Cependant d'après une étude de 2008, 37 % des femmes ayant un IMC compris entre 18 et 25 et 64 % des femmes en surpoids ont une prise de poids pendant la grossesse supérieure aux recommandations [36]. Ce non-respect des recommandations est plus important lors d'une première grossesse (34 % des femmes primipares vont au-delà des recommandations contre 16 % chez les multipares) [37]. Les femmes ayant une prise de poids plus importante pendant la grossesse peuvent développer une obésité en post-partum [38]. Linne *et al.* ont montré qu'une femme sur deux qui avait un IMC préconceptionnel dans les normes mais qui dépassait les limites de gain de poids conseillées pendant la grossesse se retrouvait en surpoids 15 ans plus tard [39].

La grossesse est un facteur de risque d'obésité en soi car le poids gagné au cours de la grossesse n'est pas systématiquement perdu par toutes les femmes [40]. De plus, un gain de poids important pendant la grossesse et/ou une obésité augmentent les risques d'apparition de prééclampsie (qui favorise à son tour le risque de pathologies cardiovasculaires) et de façon plus modérée, de diabète gestationnel (qui multiplie par 7 le risque de développement d'un diabète de type 2 ultérieur [34]).

IMC préconceptionnel	Gain de poids total
	(en kg)
Maigre (< 18,5)	12,5 - 18
Poids normal (18,5 - 24,9)	11,5 - 16
Surpoids (25 – 29,9)	7 - 11,5
Obèse (\geq 30)	5 - 9

Tableau 2: Recommandations de l’Institut de Médecine sur le gain de poids total en fonction de l’indice de masse corporelle préconceptionnel. *IMC: Indice de Masse Corporelle (calculé par le poids (kg)/(taille (m))², d’après Buschur et al., 2012.*

Lorsque les dépôts graisseux prédominent au niveau abdominal, l’obésité est souvent associée à un déséquilibre des fonctions hormonales neuroendocrines et ovariennes avec une perturbation des cycles menstruels pouvant mener à une infertilité. En plus des risques de développement d’hypertension, de diabète et de prééclampsie, les femmes enceintes avec une obésité sévère sont souvent confrontées à des dépassements de terme, des césariennes plus fréquentes et des risques d’hémorragies *post-partum* [41].

2.2.3. L’inflammation

La « méta-inflammation » est le terme qui définit le faible état inflammatoire lié à l’obésité. L’inflammation agit sur le cerveau, le pancréas, le tissu adipeux et les muscles squelettiques pouvant aboutir à des troubles métaboliques (Figure 9). L’insuline favorise le stockage des acides gras libres sous forme de lipides. L’insulinorésistance et la diminution ultérieure de la production d’insuline sont alors liées à une augmentation des acides gras libres. Cette augmentation entraîne une réponse immunitaire innée et une activation des Toll-like récepteurs (TLR) et de la voie NF κ B qui est un facteur de transcription proinflammatoire. Durant la grossesse, il a été suggéré que ces cytokines proinflammatoires pourraient altérer le transport placentaire de nutriments [42].

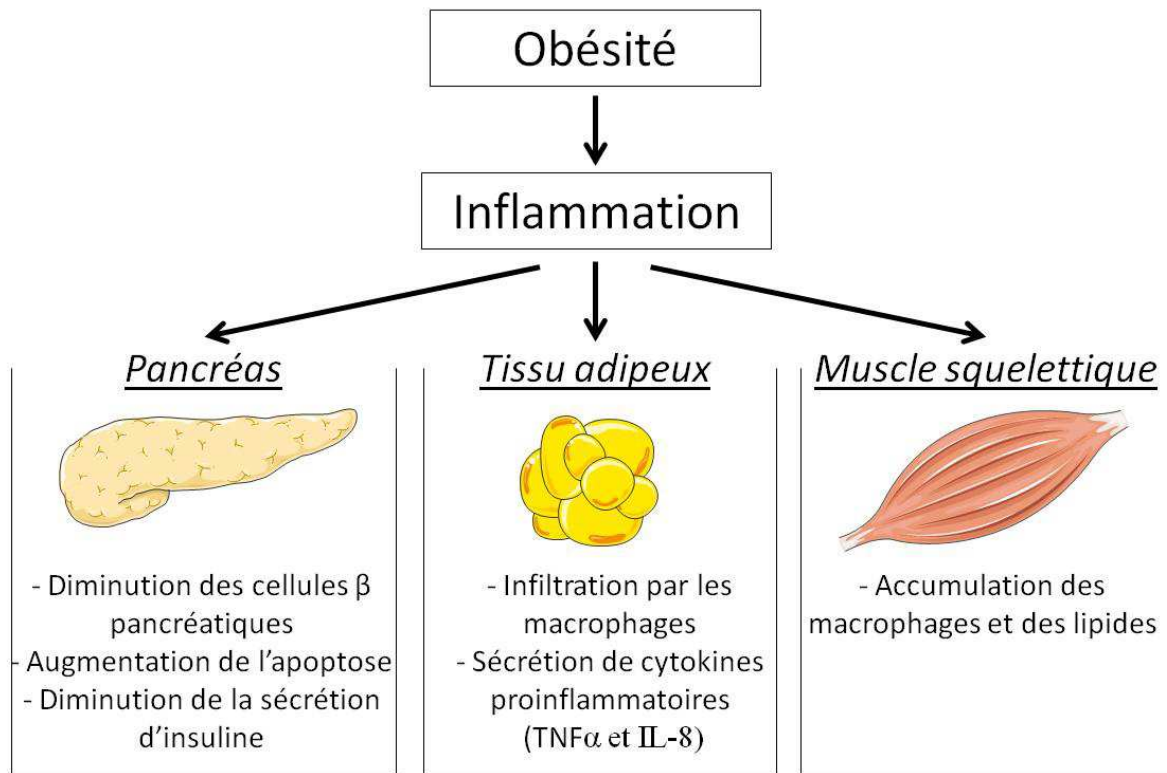


Figure 9: Effets de l'inflammation sur le pancréas, le tissu adipeux et le muscle squelettique d'après Frias et Groves, 2012. Réalisé à partir de la banque d'images Servier Médical Art.

L'inflammation, tout comme l'insulinorésistance, sont des mécanismes qui participent de façon physiologique au bon déroulement de la grossesse mais peuvent influencer un certain nombre de pathologies [43]. Ces effets sont exacerbés par l'obésité, en effet les femmes enceintes obèses ont des concentrations en cytokines, en lipides et en insuline plus élevées [42-44]. Ces altérations peuvent devenir « toxiques » et entraîner des changements de la fonction placentaire et des modifications métaboliques fœtales. Catalano *et al.* ont mesurés certains de ces paramètres métaboliques chez les fœtus nés par césarienne de mères obèses (IMC préconceptionnel à 38 kg/m²). Les mères obèses ($n=68$) étaient hyperinsulinémiques, hyperleptinémiques et présentaient des concentrations plasmatiques en interleukine 6 et en CRP (protéine C réactive) plus élevées que les mères contrôles ($n=53$). Du côté fœtal, les auteurs ont noté une adiposité plus importante, une glycémie et une insulinémie supérieures ainsi qu'une insulinorésistance. Les concentrations plasmatiques en leptine et en interleukine 6 fœtales étaient elles aussi augmentées par rapport aux concentrations observées chez les fœtus de

mères contrôles [44]. A long terme, tous ces phénomènes augmenteraient le risque d'apparition d'obésité chez la descendance (Figure 10).

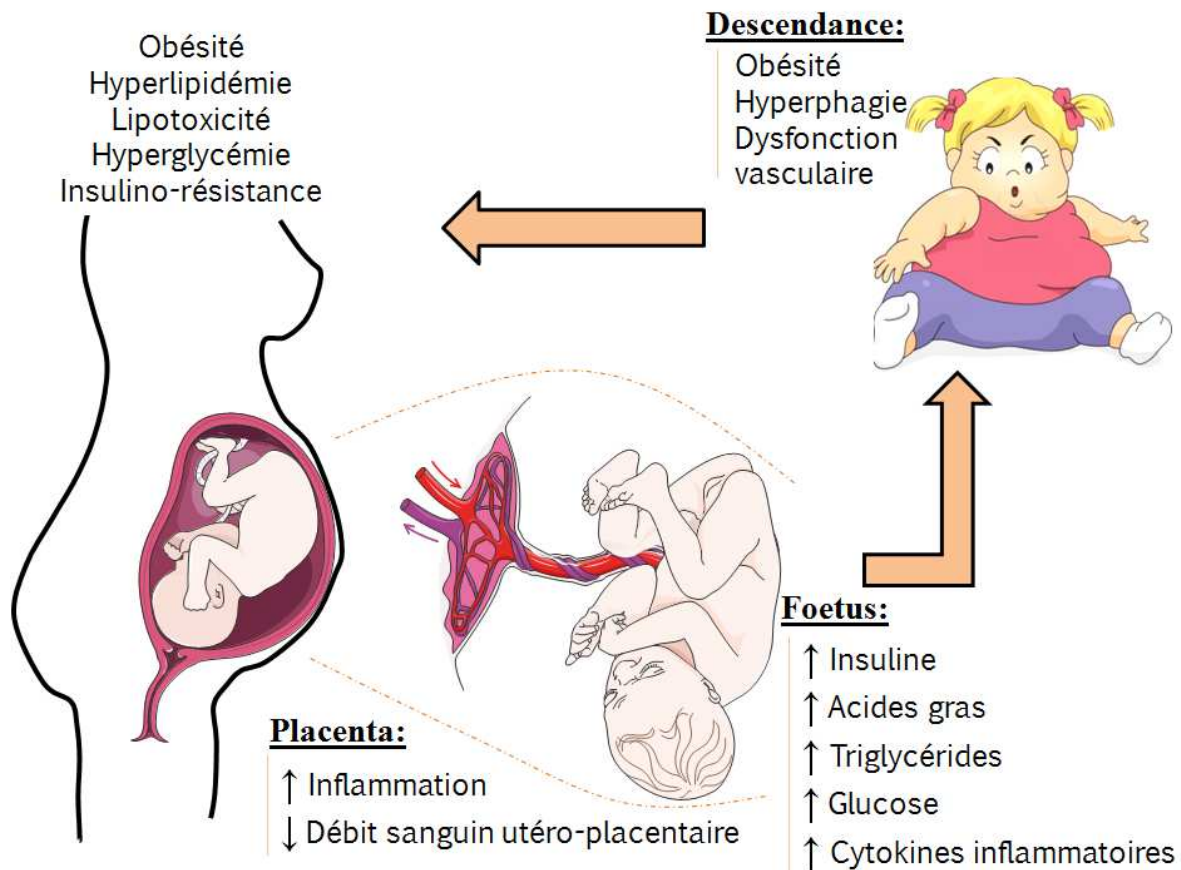


Figure 10: Conséquences de l'obésité maternelle sur le développement du placenta et du foetus (adapté de Frias et Groves, 2012). Lorsqu'il y a une obésité maternelle, la mère présente des concentrations élevées de glucose, d'insuline, d'acides gras, de triglycérides et de cytokines inflammatoires. Cet environnement entraîne des changements dans les fonctions placentaires avec pour conséquence une inflammation systémique foetale, une hyperinsulinémie, une hyperlipidémie et une lipotoxicité. Cela augmente le risque d'apparition d'obésité, de diabète et de dysfonctionnement vasculaire chez la descendance exposée. Réalisé à partir de la banque d'images Servier Médical Art.

3. LES TROUBLES DE LA CROISSANCE FŒTALE

Pendant les 9 mois de grossesse, le fœtus croît de manière régulière. Les facteurs influençant la croissance fœtale sont : l'environnement utérin maternel, le fonctionnement du placenta et le transfert des nutriments de la mère vers le fœtus.

Facteurs génétiques	<ul style="list-style-type: none">• Hérité maternelle et paternelle
Hormones fœtales	<ul style="list-style-type: none">• Insuline• <i>Insulin-like Growth Factors</i> (IGFs)
Environnement utérin	<ul style="list-style-type: none">• Fonctionnement placentaire• Flux sanguin
Facteurs de risques maternels	<ul style="list-style-type: none">• Obésité• Gain de poids pendant la grossesse• Dépassement de terme

Tableau 3: Déterminants de la croissance fœtale d'après Langer et al., 2000.

La croissance fœtale est influencée par le patrimoine génétique des parents et par les origines ethniques. Des normes de poids et de taille ont été déterminées pour chaque espèce. Chez l'Homme, à 39 semaines de grossesse le poids de naissance normal est compris entre 2,820 et 3,900 kg [45]. Des courbes de croissance standardisées ont été établies pour permettre de déterminer si le fœtus grandit de manière adaptée (*Appropriate for Gestational Age*, AGA), présente un retard de croissance intra-utérin (*Small for Gestational Age*, SGA), ou a une croissance accélérée (*Large for Gestational Age*, LGA).

Si le poids du fœtus est au-delà du 90^{ème} percentile, il est considéré comme LGA, et s'il est en dessous du 10^{ème} percentile il est considéré comme SGA (Figure 25 en annexe) [46].

Au niveau hormonal, la croissance foetale est régulée en grande partie par l'insuline. L'insuline ne traverse pas la barrière hémato-placentaire, elle est donc produite par le pancréas du fœtus (dès la 8^{ème} semaine de grossesse) [47]. Les récepteurs hépatiques à l'insuline apparaissent entre 19 et 25 semaines de grossesse. Les IGF-1 et IGF-2 (*Insulin-like Growth Factors*) sont exprimés dans tous les tissus fœtaux. L'IGF-2 est le facteur de croissance principal *in utero*. Il permet la croissance foetale, la croissance placentaire, et agit sur le transfert des nutriments. L'étude des souris génétiquement déficientes (KO) a montré qu'une altération de l'IGF-1, de l'IGF-2 ou du récepteur de l'IGF-1 réduisait considérablement la croissance des souris ; par opposition, la surexpression de l'IGF-2 est plutôt corrélée à une accélération de la croissance foetale [48;49].

L'hyperinsulinisme, les excès de nutriments (acides gras libres, triglycérides, ou glucose) et les altérations de la fonction placentaire (débit sanguin utéro-placentaire ou transport de nutriments) peuvent aussi altérer la croissance de la descendance [42].

D'après une revue de 2013 basée sur la méta-analyse de 45 études, les femmes présentant un IMC préconceptionnel bas seraient plus susceptibles de donner naissance à des enfants avec un petit poids de naissance, et par opposition, les femmes avec un IMC préconceptionnel élevé donneraient plus couramment naissance à des enfants avec un gros poids de naissance [50]. En 2009, une étude menée par Siega-Riz *et al.* a montré une association entre un gain de poids inférieur aux recommandations et la naissance de bébés avec un faible poids. Par opposition, avec un gain de poids supérieur aux recommandations, les mères donnaient naissance plus souvent à des enfants macrosomes (poids de naissance élevé) [38]. Ces données peuvent être mises en relation avec le transport placentaire des nutriments au fœtus. Des « signaux » de faible disponibilité de nutriments comme des concentrations basses d'insuline et de leptine et une concentration élevée d'adiponectine seraient associées à une diminution du transport des nutriments et en conséquence une diminution de la croissance foetale. A l'inverse, une insulinémie et une leptinémie élevée avec une concentration plasmatique en adiponectine basse refléteraient une abondance de nutriments et augmenterait le transport des nutriments au niveau du placenta ayant pour résultat une accélération de la croissance foetale [15].

3.1. Le retard de croissance intra-utérin

3.1.1. Définition

Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) correspond à un défaut de croissance ne permettant pas au fœtus d'atteindre le poids attendu à un âge gestationnel donné. Lorsque le poids du fœtus ou du nouveau-né est inférieur au 10^{ème} percentile on parle de RCIU (Figure 25 en annexe, [46]).

Le RCIU peut être harmonieux (ou symétrique) avec une réduction du périmètre crânien, de la taille, du périmètre abdominal et du poids. Ce type de RCIU est souvent retrouvé lors de pathologies intervenant en début de grossesse, qui retentit sur l'ensemble de la croissance. Il existe également des hypotrophies non harmonieuses (ou asymétriques). Dans ce cas, le périmètre crânien est normal mais la taille, le poids et le périmètre abdominal sont réduits. Ces RCIU sont majoritairement d'origine vasculaire, comme dans la prééclampsie par exemple, et sont le reflet d'une insuffisance placentaire en fin de grossesse [51].

3.1.2. Etiologie

Les causes d'un ralentissement de la croissance du fœtus peuvent être d'origine fœtale, d'origine maternelle ou d'origine placentaire. Les causes fœtales sont souvent des anomalies génétiques, des anomalies congénitales ou alors des grossesses multiples. Le placenta peut engendrer un RCIU lorsqu'il y a une insuffisance placentaire, un défaut d'implantation ou une anomalie vasculaire. Enfin, le paramètre maternel intervient dans le cas de pathologies (diabète, hypertension, anémie, prééclampsie), lorsqu'il y a des malformations utérines, une malnutrition ou l'abus de substances comme les drogues, l'alcool ou certains médicaments [17]. Il peut aussi y avoir un retard de croissance fœtale lorsque la mère a subi un stress psychologique important pendant la grossesse (guerre, attentat) [52]. Chez l'animal, la surexposition *in utero* des hormones glucocorticoïdes (hormones surrénaliennes de la réponse au stress) a clairement été démontrée pour induire ces retards de croissance du fœtus [53].

3.1.3. Mécanismes possibles

Les mécanismes à l'origine du retard de croissance *in utero* sont imparfaitement compris. Un défaut de transport de nutriments de la mère au fœtus pourrait être incriminé, et même si les causes sont multiples, au cours de nos travaux nous nous sommes intéressés au système vasculaire et plus particulièrement à la voie du monoxyde d'azote (NO) pendant la gestation.

3.1.3.1 La voie du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote semble jouer un rôle particulièrement important dans les phénomènes d'adaptation du débit sanguin utéro-placentaire. Le NO est un messenger gazeux qui stimule l'enzyme Guanylate Cyclase et augmente les concentrations de Guanosine Monophosphate cyclique (GMPc) cellulaire impliqués dans la relaxation des vaisseaux. Il est produit par les enzymes NO Synthases dont il existe 3 isoformes : l'isoforme neuronale (nNOS), l'isoforme inductible (iNOS) et l'isoforme endothéliale (eNOS). Pendant la grossesse, la production de monoxyde d'azote placentaire est stimulée, ce qui permet de maintenir l'utérus à l'état quiescent jusqu'à l'accouchement [54]. Le NO a une triple action vasodilatatrice : une directe sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux et deux indirectes en activant la sécrétion de substances vasodilatrices telle que la prostacycline 2 et en inhibant celles de substances vasoconstrictrices telles que le thromboxane A2 et l'endothéline 1 [55]. Des altérations de l'ensemble de ces mécanismes régulateurs de la vasomotricité seraient impliquées dans l'apparition de la prééclampsie [21].

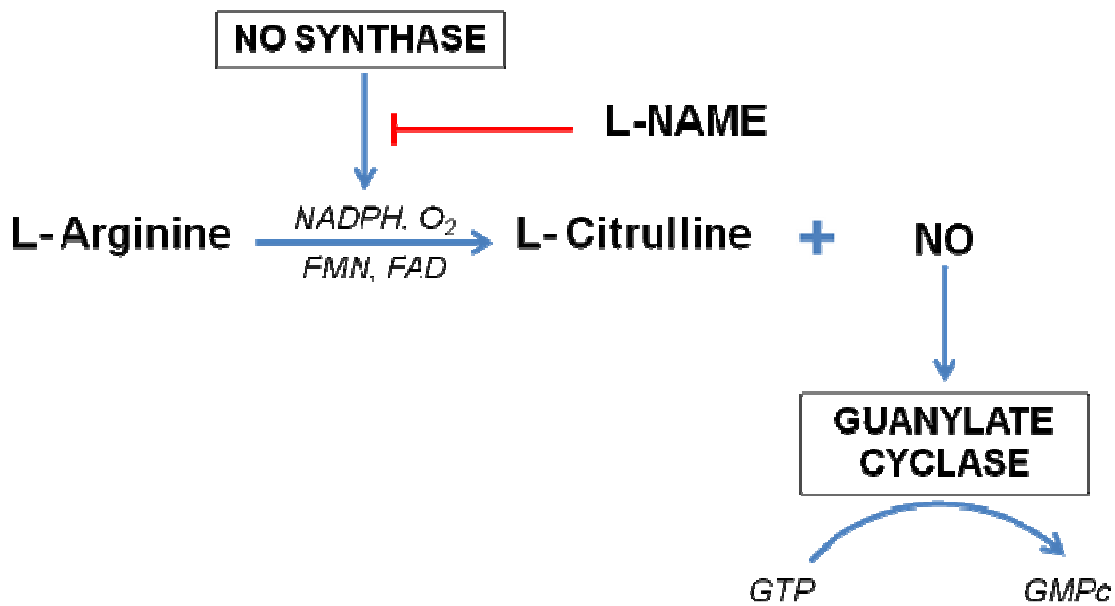


Figure 11: Synthèse du monoxyde d'azote (NO). *NADPH*: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, *FMN*: flavine mononucléotide, *FAD*: flavine adénine dinucléotide, *L-NAME*: *N*- ω -nitro-*L*-Arginine méthylester, *O*₂: dioxygène, *GMPc*: Guanosine Monophosphate cyclique, *GTP*: Guanosine triphosphate, d'après Ghalayini et al., 2004.

3.1.3.2. Monoxyde d'azote et croissance

Dans le cadre d'une insuffisance placentaire, la croissance du fœtus est ralentie. La cause la plus courante dans cette situation est un défaut de transfert de nutriments au fœtus lié à un contrôle vasomoteur maternel maintenu et à une vasodilatation des artères spiralées insuffisante [18]. En se basant sur cette donnée, l'équipe de Winer *et al.* a mené une étude sur les effets d'une supplémentation en L-Arginine (précurseur du NO, Figure 11, [56]) lors de grossesses avec prééclampsie et RCIU. Deux groupes de femmes enceintes ont été étudiés : un groupe « RCIU + placebo » ($n=22$) et un groupe « RCIU + L-Arginine 14 g/jour » ($n=21$). Ce traitement n'a pas permis d'améliorer la croissance des fœtus (1042 ± 476 g vs. 1068 ± 452 g) [57]. D'après cette étude, la stimulation de la voie du NO ne semble pas suffisante pour améliorer la croissance fœtale dans cette situation pathologique, néanmoins, d'autres substances vasodilatatrices pourraient pallier ce problème. Dans la suite de ce mémoire, l'implication de la voie des Rho-kinases sera détaillée ainsi que le rôle probable du système apelinergique.

3.2. La macrosomie

3.2.1. Définition

La macrosomie foetale est le terme attribué à un enfant dont le poids de naissance est supérieur à 4 kg. Un fœtus qui naît avant le terme avec un poids inférieur à 4 kg mais tout de même supérieur au 90^{ème} percentile des courbes de croissance attendues est qualifié de LGA (*Large for Gestational Age*). Ces deux notions traduisent une accélération de croissance *in utero*.

Les facteurs de risques principaux pouvant mener à une macrosomie sont :

- des troubles de l'homéostasie glucidique au cours de la gestation (diabète)
- un IMC préconceptionnel supérieur à 25 kg/m² (surpoids et obésité maternelle)
- un gain de poids important au cours de la grossesse
- un âge avancé au moment de la grossesse
- un dépassement du terme [58].

La macrosomie peut être détectée grâce à l'examen clinique ou l'échographie. La naissance d'un bébé macrosome peut entraîner des complications telles que la dystocie des épaules ou une paralysie du plexus brachial [58].

Elle peut être divisée en 2 sous-groupes : la macrosomie constitutionnelle (symétrique) qui résulte de l'action des facteurs génétiques et d'un environnement utérin normal ; et la macrosomie métabolique (asymétrique) qui apparaît le plus souvent lorsque l'homéostasie glucidique maternelle n'est pas maîtrisée : c'est l'hypothèse de l'hyperglycémie maternelle-hyperinsulinisme foetal. Lorsque la glycémie maternelle est élevée, le glucose traverse la barrière hémato-placentaire, cela entraîne une hyperglycémie foetale et favorise une sécrétion d'insuline par le pancréas. L'insuline et les *Insulin-like Growth Factors* étant les principales hormones agissant sur la croissance *in utero*, cela explique que l'hyperinsulinisme foetal en réponse à l'hyperglycémie maternelle non régulée provoque une macrosomie avec organomégalie [45].

3.2.2. Etiologie

Un diabète gestationnel ou une obésité maternelle peuvent entraîner une macrosomie foetale [34;41]. Cette caractéristique est retrouvée dans 5 % des grossesses environ et tout

comme le RCIU, la macrosomie peut augmenter le risque d'apparition de perturbations métaboliques ultérieures [59]. Les enfants nés macrosomes ont deux fois plus de risques d'être obèses et de développer un diabète [60] ou des pathologies cardiovasculaires à long terme [61].

Il est donc important de prendre en compte les facteurs de risques et de réguler la glycémie et le gain de poids pendant la grossesse, en respectant les recommandations établies par les autorités de santé à savoir, maintenir un exercice physique modéré et adapter son alimentation pour qu'elle soit bien équilibrée [58].

3.2.3. Mécanismes possibles

Tout comme les mécanismes d'apparition du retard de croissance intra-utérin, les mécanismes régulant la croissance foetale en faveur d'une macrosomie sont imparfaitement compris. La prise de poids excessive au cours de la grossesse est un facteur de risque mais pourquoi les femmes obèses qui limitent leur gain de poids lorsqu'elles sont enceintes présentent-elles quand même plus de risques de donner naissance à des enfants qui pèseront plus de 4,0 kg à la naissance ?

Le système endocrinien du sujet obèse est fortement altéré, ces perturbations affectent tout particulièrement la régulation du métabolisme énergétique notamment par l'action des adipokines. La plus connue est la leptine, sa concentration est corrélée positivement à l'obésité et à l'IMC [62]. En 2001, Christou *et al.* ont montré que la corrélation entre la concentration en leptine plasmatique et le poids pouvait se vérifier dès la naissance avec la mesure de la leptinémie dans le sang de cordon ombilical et le poids de naissance. Dans cette étude, ils suggèrent que la leptine pourrait avoir un rôle activateur du système des IGF et participer à l'accélération de croissance *in utero* [63]. Ce résultat démontre l'implication de la leptine produite par le fœtus mais il n'est pas exclu que la leptinémie maternelle pourrait avoir un impact sur la croissance foetale. Pour la suite des expérimentations menées, nous nous sommes intéressés à une autre adipokine : l'apeline.

3.2.3.1. Une adipokine cible : l'apeline

L'apeline et son récepteur APJ sont exprimés de manière ubiquitaire dans l'organisme permettant une action centrale et périphérique. Le système apelinergique intervient dans la régulation de la réponse immunitaire, dans l'homéostasie hémodynamique, le stress

oxydatif lié à l'athérosclérose, l'homéostasie des fluides corporels, le métabolisme glucidique et énergétique mais aussi dans l'angiogenèse [64].

3.2.3.1.1. Biosynthèse et dégradation

Le gène de l'apeline est localisé sur le chromosome X. Il existe différentes isoformes de l'apeline : l'apeline-36, l'apeline-17, l'apeline-13, la Pyr-apeline-13 (avec un pyroglutamate en position 1) et l'apeline-12 (Figure 12), toutes dérivées de la partie C-terminale de la préproapeline de 77 acides aminés. Ces différentes isoformes sont très conservées selon les espèces avec les 23 derniers résidus en partie C-terminale identiques chez les Mammifères [65;66]. La Pyr-apeline 13 est la forme qui résistera le mieux à la dégradation enzymatique et donc dont la fonction biologique est la plus préservée [65;67]. L'activité biologique de l'apeline-13 est 8 fois plus importante que celle de l'apeline-17 et 60 fois plus élevée que l'apeline-36, ce qui laisse supposer que ce sont les formes courtes qui se fixent sur les récepteurs pour engendrer des réponses biologiques [68].

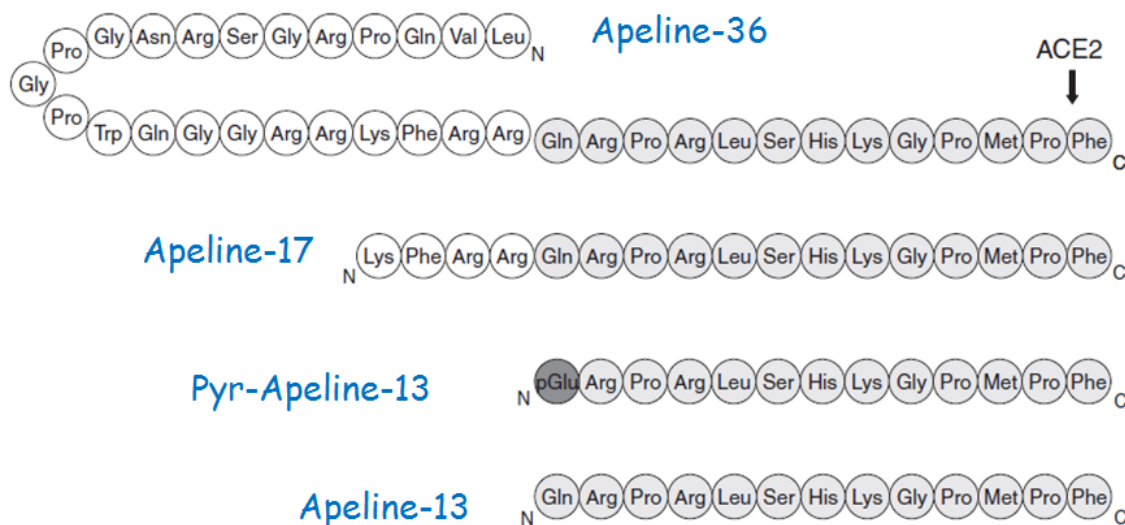


Figure 12: Séquence en acides aminés des différentes isoformes de l'apeline (d'après Pitkin et al., 2010). La flèche noire indique le site de clivage de l'ACE2. N : Partie N-terminale, C : Partie C-terminale. L'apeline-12 n'est pas représentée sur cette figure mais est aussi une isoforme active de l'apeline (O'Shea et al. 2003).

La séquence en acides aminés de la préproapeline comprend de nombreuses paires d'acides aminés basiques (Arginine-Arginine ou Arginine-Lysine) laissant supposer une

action de clivage par les endopeptidases à l'origine des différents peptides cités précédemment.

L'ACE2 (*angiotensin-converting enzyme 2*) clive l'apeline-36 et l'apeline-13 à la position indiqué en Figure 12 [69]. Ce clivage n'entraîne pas de diminution d'activité de l'apeline ou d'internalisation du récepteur APJ suggérant que cette modification post-traductionnelle entraîne uniquement un changement de conformation du peptide clivé [70].

3.2.3.1.2. APJ : récepteur ubiquitaire

a) Localisation

La séquence codante du récepteur APJ est située sur le chromosome 11 chez l'Homme [71]. Au niveau central, il est exprimé dans un grand nombre de zones telles que l'hippocampe, l'hypothalamus, la glande pinéale ou encore l'amygdale. Alors qu'au niveau périphérique, il a été retrouvé dans le cœur, les poumons, la rate, les reins, l'estomac, le placenta, les intestins, le tissu adipeux...[72].

b) Action paracrine / autocrine

De manière générale, les organes exprimant le récepteur APJ exprime également l'apeline, ce qui laisse suggérer une action paracrine ou autocrine dans ces mêmes tissus. En réponse à l'expression étendue du système apelinergique dans l'organisme, l'action de ce système est très variée et dépend du tissu dans lequel l'apeline et son récepteur agissent [73].

c) Internalisation

Lorsqu'une isoforme d'apeline se fixe sur son récepteur, celui-ci est internalisée et entre dans un trafic intracellulaire ayant pour finalité l'activation des voies de signalisation, le recyclage à la membrane ou la dégradation [74]. Cette internalisation diffère selon l'isoforme d'apeline qui interagit avec le récepteur APJ.

A l'état basal, le récepteur APJ est situé sur la membrane des cellules ; en présence d'apeline-13 dans le milieu, le récepteur est phosphorylé par des kinases des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), il forme un complexe avec les β -arrestines puis se

retrouve dans des vésicules intracellulaires et est rapidement recyclé à la membrane ou acheminé en direction des lysosomes pour une dégradation [75]. Ce trafic est en partie orchestré par les protéines GTPases Rab, et c'est grâce à une association à la protéine Rab4 que le récepteur APJ stimulé par l'apeline-13 est recyclé rapidement, alors que la protéine Rab7 conduira le récepteur vers les lysosomes. L'apeline-13 a une meilleure affinité pour le récepteur APJ et est plus puissante mais elle se dissocie aussi plus rapidement. En effet, un pré-traitement (inférieur à 30 minutes) de cellules CHO par apeline-13 n'empêche en rien la réponse du récepteur APJ présent sur ces cellules après ajout d'apeline-13 dans le milieu de culture [76].

En se fixant sur son récepteur spécifique, l'apeline-36 l'engage dans un cycle plus lent puisque les β -arrestines restent associées à celui-ci et ce jusqu'à 2 heures après le retrait du peptide du milieu, où l'on observe que ses récepteurs sont toujours internalisés [75]. L'apeline-17 agit elle aussi sur APJ en provoquant son internalisation avec un pouvoir plus important que celui de la Pyr-apeline 13 [70].

d) Les voies de signalisation

Sur des cellules CHO : un ajout d'apeline-13 ou -36 provoque une acidification du milieu de culture. Cette acidification illustre l'activation des cellules exprimant le récepteur APJ. L'activation serait dépendante au moins en partie de l'interaction avec une protéine Gi (car cette réponse cellulaire est absente en cas d'ajout de toxine pertussique (PTX) dans le milieu (un inhibiteur des protéines Gi) et d'un échangeur Na^+/H^+ (car, de la même façon, la réponse cellulaire n'est pas retrouvée lorsque le milieu est enrichi en méthylisobutyl amiramide (MIA), un inhibiteur de cet échangeur) [76].

Dray *et al.* ont démontré l'implication *in vivo* de la voie dépendante du NO (eNOS) dans l'augmentation de l'utilisation du glucose dans les muscles squelettiques régulée par l'apeline [77]. Cependant, Yue *et al.* en 2009 ont montré l'absence de modification de la captation cellulaire du glucose après ajout de L-NAME (inhibiteur des NOS) dans une culture de cellules musculaires squelettiques [78]. L'apeline augmente l'utilisation du glucose et la sensibilité à l'insuline en passant par une phosphorylation d'Akt en partie modulée par les protéines Gi et une voie dépendante de l'AMPK (protéine kinase activée par l'AMP) puisque l'ajout d'inhibiteurs de l'AMPK (Composant C ou Si-ARN) diminuent de manière significative l'utilisation du glucose *in vitro* [78].

C'est à l'aide de son récepteur APJ que l'apeline activerait la phosphorylation de la protéine Akt en Ser⁴⁷³ et de la protéine eNOS en Ser¹¹⁷⁷, puisque cette activation n'est pas retrouvée chez les souris KO pour le récepteur APJ [79;80].

L'AMPK passerait par une phosphorylation de l'IRS-1 (*Insulin receptor substrate-1*) et impliquerait la PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) (Figure 13) [81;82].

Une injection d'apeline permet de diminuer la glycémie en augmentant l'utilisation du glucose surtout dans les muscles squelettiques via l'AMPK et une voie dépendante de la NO Synthase endothéliale [77].

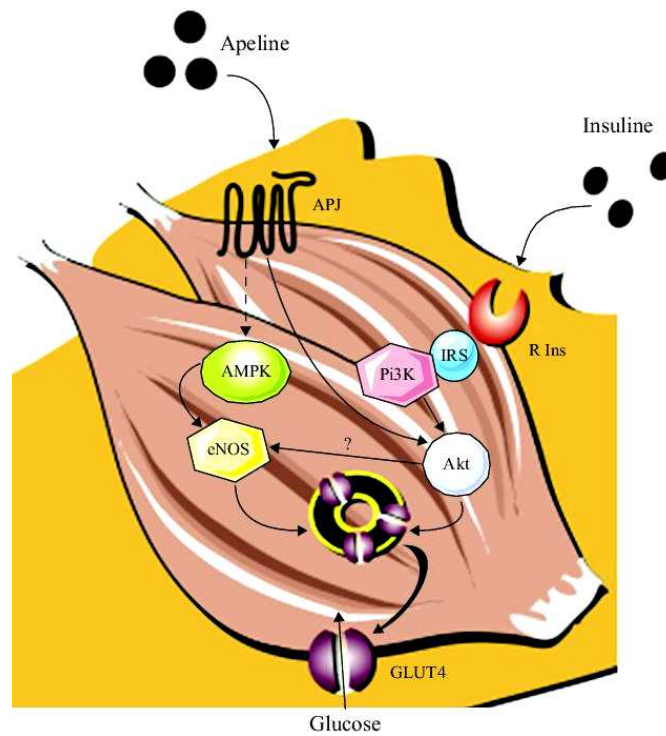


Figure 13: Voies de signalisation impliquées dans l'utilisation du glucose par le muscle induite par l'apeline. Dray et al. 2009.

La phosphorylation de l'IRS-1 sur le résidu sérine 789 (qui pourrait participer à une amélioration de l'insulinorésistance) serait dépendante elle aussi de l'activité de l'AMPK après activation par l'apeline [81]. D'une manière générale, la régulation de l'AMPK par l'apeline permettrait d'augmenter la captation du glucose par les muscles squelettiques, de limiter la sécrétion d'insuline par le pancréas, de réguler la lipolyse et la lipogenèse et de modifier le comportement alimentaire [83].

3.2.3.1.3. La régulation du métabolisme glucidique par l'apeline

Les souris KO pour l'apeline (APKO) sont hyperinsulinémiques et ont une tolérance à l'insuline amoindrie. Une supplémentation en apeline-13 (2 mg/kg/jour) à l'aide de pompes osmotiques permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline chez les souris APKO mais cet effet est également retrouvé chez les souris obèses et diabétiques *db/db* [78].

L'état nutritionnel agirait aussi sur la régulation de l'apelinémie puisque lors d'un jeûne, quand les concentrations d'insuline sont diminuées, de la même manière, les concentrations d'apeline le sont aussi. Le jeûne réduit l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux mais celle-ci est rétablie par un retour à une alimentation normale [84].

L'apeline est un peptide présent dans le pancréas (dans les cellules α et en particulier dans les cellules β) [85]. Le récepteur APJ est lui présent sur cellules β pancréatiques [86] et l'apeline-36 est capable d'inhiber la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose en agissant directement sur les cellules β pancréatiques chez la souris [87]. Au niveau central, lorsque de l'apeline est injectée dans le 3^{ème} ventricule de souris contrôles, les effets métaboliques dépendent de la dose utilisée. A faible dose (10 pM), l'insuline diminue la glycémie, et augmente la tolérance au glucose et à l'insuline ; alors qu'avec une dose élevée (20 nM), l'apeline augmente considérablement l'insulinémie et la glycémie à jeun, et induit à terme une insulino-résistance [88].

Chez l'animal, dans le cadre du diabète de type 2, l'expression d'apeline est augmentée dans le pancréas [85]. En sachant que les maladies métaboliques (dont le diabète fait partie) entraînent des complications cardiaques (du type insuffisance cardiaque ou athérosclérose), Xu *et al.* se sont intéressés à l'implication de l'apeline dans l'utilisation du glucose cardiaque. Un traitement par apeline (2 mg/kg/jour) pendant 7 jours à l'aide de pompes osmotiques (qui limite les problèmes de la ½ vie courte) chez des souris a permis de montrer que l'apeline augmentait la captation du glucose dans le muscle cardiaque *in vivo*. Des études *in vitro* ont permis de compléter cette information puisque nous savons maintenant que l'apeline augmente la translocation des transporteurs GLUT4 du cytoplasme à la membrane des cellules cardiaques [81].

3.2.3.1.4. L'apeline : rôle dans l'obésité

L'insuline stimule l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux [82]. L'obésité associée à une augmentation de l'insulinémie entraîne une insulino-résistance et une augmentation de l'apeline (augmentation de l'expression dans les adipocytes et de l'apeline plasmatique). Dans ce modèle, c'est l'hyperinsulinisme qui semble être indispensable à l'apparition d'une hyperapelinémie [84].

L'obésité est aussi liée à une augmentation de TNF α - *Tumor necrosis factor α* -, plus précisément, l'expression génique du TNF α dans le tissu adipeux blanc est positivement corrélée à l'indice de masse corporelle des sujets minces et obèses. En culture, une augmentation endogène de TNF α est suivie 6 à 9 h plus tard par une augmentation de la concentration d'apeline dans des adipocytes [89]. Cette activation de l'expression d'apeline est également retrouvée après une injection intra-péritonéale de TNF α chez des souris C57Bl/6J [89].

Le TNF- α , la GH et l'insuline régule l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux blanc [90]. D'autre part, une étude clinique menée chez 20 femmes obèses (IMC : $32,2 \pm 6,4$ kg/m²) en comparaison à 12 femmes minces (IMC : $20,7 \pm 0,6$ kg/m²) a révélé une augmentation importante de la concentration en apeline, en insuline et en TNF α plasmatiques, associés à une augmentation de l'expression de l'apeline dans le tissu adipeux des obèses. Cette étude a également montré qu'une nutrition hypocalorique pendant 12 semaines permettait de diminuer significativement les concentrations d'apeline, d'insuline et de TNF α circulants [91].

L'apeline est exprimée dans le tissu adipeux blanc et dans le tissu adipeux brun bien que la plupart des adipokines ne soient exprimées que par l'un ou l'autre de ces tissus [64]. Le tissu adipeux blanc est majoritairement utilisé pour le stockage des graisses alors que le tissu adipeux brun permet l'oxydation des graisses et dissipe de l'énergie sous forme de chaleur à l'aide de la protéine découplante mitochondriale UCP1, une protéine localisée sur la membrane interne des mitochondries [92]. La protéine découplante UCP2 est ubiquitaire et l'UCP3 est retrouvée dans le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc. Chez la souris, un traitement par l'apeline (injection pendant 14 jours à 0,1 mol/kg d'apeline 13) entraîne une diminution du poids et de l'insulinémie mais aussi des triglycérides et d'acides gras libres. Ce traitement permet d'augmenter la tolérance au

glucose et la dépense énergétique grâce à une augmentation de l'UCP1, et de l'UCP3 qui augmentent la température corporelle et la consommation d'oxygène [93].

3.2.3.1.5. Les différentes fonctions du système apelinergique dans l'organisme

a) Action centrale

Grâce au développement d'anticorps anti-apeline, une cartographie précise des neurones apelinergiques a pu être établie. Ces neurones ont été retrouvés en grande quantité dans l'hypothalamus, plus précisément dans les noyaux paraventriculaires (PVN) et supra-optiques (SON) qui sont des zones qui interviennent dans les processus endocriniens et dans l'homéostasie énergétique [94]. Des neurones sécrétant l'apeline ont aussi été retrouvés dans la couche interne de l'éminence médiane et dans l'hypophyse postérieure puisque les neurones apelinergiques sont colocalisés avec les neurones magnocellulaires à vasopressine et ocytocine qui se projettent du PVN et du SON dans l'hypophyse postérieure. D'autre part, certaines zones de régulation de la prise de boisson au niveau du cerveau expriment elles-aussi l'apeline et son récepteur (lame terminale, le long du troisième ventricule) [72;95].

L'expression de l'APJ dans l'hypothalamus est très importante dans le PVN, le SON, la glande pinéale et les lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse [66].

- La modulation de l'équilibre hydrique

La vasopressine est un peptide vasoconstricteur et antidiurétique dont la sécrétion par les neurones magnocellulaires du PVN et du SON dépend des conditions de volémie et d'osmolalité plasmatique de l'organisme [96]. Les neurones vasopressinergiques sont activés en cas de déshydratation dans le but d'augmenter la prise de boisson et de limiter la diurèse via la sécrétion et la libération de la vasopressine dans le sang [96]. L'apeline, bien que sécrétée par les mêmes neurones semble avoir un effet opposé ; en effet, l'étude de Reaux *et al.* a montré qu'une injection au niveau central d'apeline (apeline-13 ou -17) diminuait significativement la prise de boisson chez des rats déshydratés pendant 24 heures [94]. Ces données révèlent une action de l'apeline dans le maintien d'un équilibre hydrique plutôt en faveur de la diurèse. Une action directe de l'apeline sur le rein n'est

pas exclue puisque l'apeline et son récepteur sont tous les deux exprimés dans les tissus rénaux chez les rongeurs et chez l'Homme au niveau des tubules rénaux [72;95].

- La régulation de la prise alimentaire

En ce qui concerne la régulation de la prise alimentaire par le système apelinergique, la littérature rapporte des données plutôt contradictoires. L'injection intra-cérébroventriculaire d'apeline-13 (1 µg/jour) chez la souris pendant 10 jours a pour conséquence une augmentation de la prise alimentaire, de la dépense énergétique et la température corporelle avec prise de poids (l'augmentation de l'activité n'étant pas suffisante pour compenser l'hyperphagie) [97]. Les effets de l'apeline sur la prise alimentaire dépendraient du statut nutritionnel des animaux, s'ils sont à jeun ou nourris. Chez le rat, l'administration intra-cérébro-ventriculaire d'apeline-13 diminue la prise alimentaire chez des rats nourris ou non [98]. La prise alimentaire serait diminuée si l'injection d'apeline était réalisée avant la phase nocturne alors qu'elle serait augmentée, même chez des rats nourris si elle était réalisée en journée [99]. Pourtant, en 2011, Reaux-Le Goazigo *et al.* ont montré que les neurones à POMC (Proopiomélanocortine, précurseur de l' α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), un peptide anorexigène) présentaient une colocalisation avec les neurones apelinergiques et que les neurones à POMC expriment le récepteur APJ [100]. En cas d'obésité, l'augmentation de la concentration d'apeline dans l'hypothalamus permettrait de produire de l' α -MSH et donc de réduire la prise alimentaire dans le but de limiter la prise de poids. L'hyperapelinémie entraînant une désensibilisation du récepteur APJ hypothalamique pourrait expliquer l'obésité chez des souris soumises à un régime hypercalorique [86].

b) Effets cardiovasculaires

- La vasodilatation

Le récepteur APJ est présent sur les cellules endothéliales [101]. L'expression importante de l'apeline dans ces cellules peut expliquer les taux d'expression très élevés retrouvés dans les tissus hautement vascularisés (cœur, reins, poumons...) [72].

Chez le rongeur, l'apeline exogène entraîne une diminution de la pression artérielle, ce qui laisse supposer un pouvoir vasodilatateur [102]. Pour tester cette hypothèse chez

l'Homme, 24 hommes âgés de 19 à 24 ans ont été perfusés par de la Pyr-apeline-13 et de l'apeline-36 à des doses croissantes. Cette étude a montré que ces deux isoformes entraînaient une vasodilatation dans le bras perfusé avec un effet dose-dépendant plus durable pour l'apeline-36 (persistance de l'augmentation du débit sanguin jusqu'à 42 minutes après l'arrêt de la perfusion) que pour la Pyr-apeline-13 qui atteint une phase plateau dans un délai plus court (15 min environ). Cette vasodilatation est inhibée par l'ajout de L-NMMA (inhibiteur des NO synthases) ce qui montre que l'effet vasodilatateur de l'apeline est dépendant de la NO synthase endothéliale [103].

Lorsque l'apeline se fixe sur le récepteur APJ des cellules endothéliales, cela permet une vasodilatation NO-dépendante. En revanche, si l'apeline active le récepteur APJ présent sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux (en cas d'endothélium lésé par exemple), cela entraîne une vasoconstriction (Figure 14) [90].

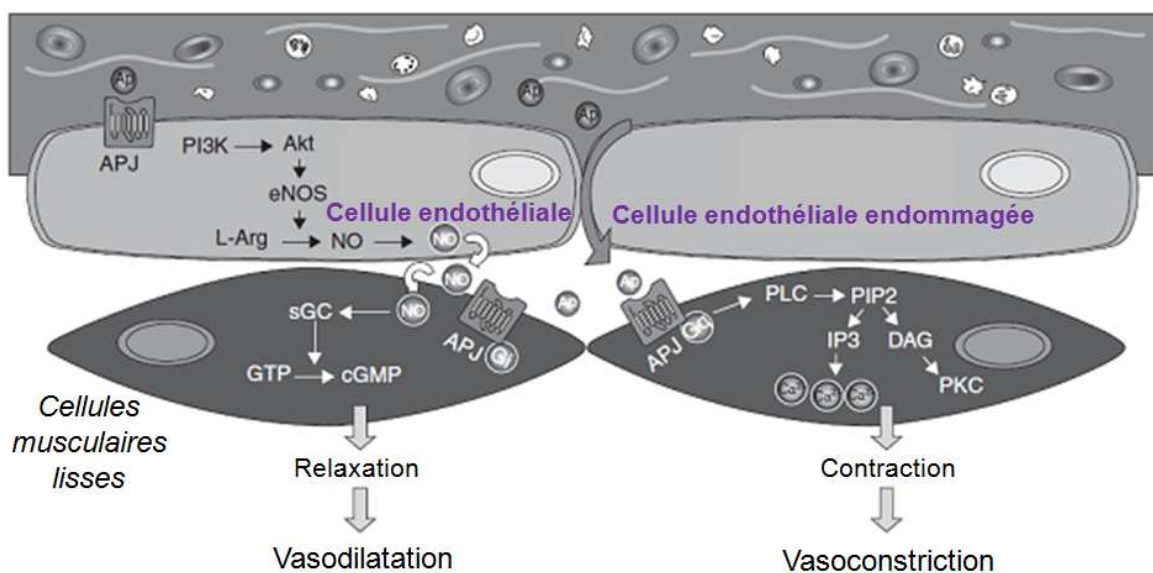


Figure 14: Voies de signalisation responsables de la vasodilatation/vasoconstriction

en réponse à l'apeline. Akt : protéine Akt, Ap : Apeline, APJ : récepteur de l'apeline, cGMP : Guanosine Monophosphate cyclique, DAG : Diacylglycérol, eNOS : NO synthase endothéliale, Gi : protéine G inhibitrice, Gq : protéine Gq, GTP : Guanosine triphosphate, IP3 : Inositol-3,4,5-phosphate, L-Arg : L-Arginine, NO : Monoxyde d'azote, PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, PI3K : Phosphoinositide 3-kinase, PLC : Phospholipase C, sGC : Guanylate cyclase soluble (Falcao-Pires et al. 2010).

La modulation du tonus vasculaire n'interviendrait pas uniquement par une vasodilatation NO-dépendante puisque même si l'apeline diminue le tonus vasculaire de

25 à 50 % et elle est aussi capable d'inhiber la vasoconstriction induite par l'angiotensine-II [90]. Cette action est aussi présente chez des souris *db/db* qui répondent à une exposition à l'angiotensine-II *in vitro* par une vasoconstriction des anneaux aortiques très importante mais qu'un traitement par l'apeline peut amoindrir [104]. Récemment, il a été démontré que le récepteur à l'apeline APJ est capable de former des hétérodimères avec le récepteur de type 1 à l'angiotensine-II et de l'inactiver [105]. Il semble donc qu'il existe un lien fonctionnel important entre le système apelinergique (vasodilatateur) et le système rénine-angiotensine (vasoconstricteur) dans le contrôle de la vasomotricité.

- La contractilité cardiaque

L'apeline est présente dans le myocarde, et dans l'endothélium du cœur, des gros vaisseaux, des veines et des artères [106]. C'est en 2002 que Szokodi *et al.* ont montré une augmentation de la contractilité du cœur après une injection d'apeline-16. Les concentrations utilisées étaient très faibles (0,01 à 10 nM), ce qui permet de dire que l'apeline est un puissant agent inotrope positif [107]. De plus, l'apeline augmente la contractilité du cœur indépendamment des récepteurs à l'angiotensine II ou de l'endothéline-1, ou encore des récepteurs α et β -adrénergiques et de la eNOS [90].

Un exercice physique régulier (9 semaines d'entraînement de nage) provoque une augmentation des concentrations d'apeline plasmatique, cardiaque et dans les vaisseaux chez des rats spontanément hypertendus (rats SHR). Les auteurs émettent l'hypothèse que c'est par ce biais que l'exercice limite l'hypertension chez les animaux en condition d'activité physique marquée. [108]. L'apeline aurait aussi un rôle cardioprotecteur en diminuant l'apoptose via la voie PI3K/Akt dans le myocarde et en réduisant la fibrose cardiaque induite par l'angiotensine-II [90]. Enfin, une diminution de l'apelinémie serait retrouvée chez les patients atteints d'une insuffisance cardiaque [109;110], ce qui suggère que l'apelinémie puisse chez l'Homme être un marqueur de pathologie cardiaque [102].

- L'angiogénèse

L'apeline est connue pour être un facteur angiogénique dans les cellules de rétine [111], et APJ a été découvert dans les cellules précurseurs de la vascularisation embryonnaire

[112]. L'apeline est également connue pour être un facteur mitogène et de migration des cellules endothéliales [90].

En 2007, Malamitsi-Puchner *et al.* ont comparé les concentrations en apeline plasmatique chez 40 couples mère/enfant en période d'accouchement et jusqu'à 4 jours après l'accouchement. L'apelinémie maternelle et foétale (prélèvement de sang de cordon ombilical), au 1^{er} jour et au 4^{ème} jour chez le nouveau-né montrent des variations importantes. L'apelinémie foétale est plus élevée que l'apelinémie maternelle au moment de la naissance, ce qui laisse présager une production par le placenta qui pourrait sécréter dans les compartiments maternels et foetaux cette hormone pendant la grossesse [113]. Etant donné que l'apeline est connue pour agir sur la croissance des vaisseaux, et sur la prolifération des cellules endothéliales et qu'elle est fortement exprimée dans les vaisseaux embryonnaires [114], la forte concentration plasmatique d'apeline retrouvée chez les fœtus pourrait être le reflet d'une production accrue pour aboutir à une angiogenèse *in utero*. La diminution de l'apelinémie à J1 serait corrélée à l'élimination du placenta [113]. Enfin, l'augmentation à J4 de l'apelinémie observée serait corrélée à une augmentation de l'activité angiogénique *ex utero* d'après Malamitsi-Puchner *et al.* [113].

c) Autres effets

- La relaxation musculaire

Il est connu aujourd'hui que l'obésité entraîne des difficultés au moment de la parturition [41] et les adipokines produites par le tissu adipeux en excès pourraient causer des troubles des contractions utérines. L'équipe d'Hehir a mis en place un modèle *in vitro* d'étude de la contractilité du myomètre humain en présence ou non d'ocytocine (stimulateur de contraction). Cette étude a révélé que tout comme la leptine et la ghréline [115;116], l'apeline peut inhiber les contractions utérines de 38 % sans ocytocine et de 30 % avec stimulation par l'ocytocine. Cette donnée nouvelle montre que l'apeline peut avoir un effet relaxant sur les muscles lisses non vasculaires [117]. On peut aussi émettre l'hypothèse que chez la femme obèse, une surproduction de l'apeline pourrait maintenir plus longtemps le muscle utérin à un état quiescent et au final allonger le terme et/ou la durée de l'accouchement qui sont deux phénomènes observés en clinique.

- L'absorption du glucose intestinal

Le récepteur APJ est exprimé par les entérocytes. Il a été récemment montré qu'en réponse à une charge orale de glucose chez la souris, la sécrétion d'apeline par les cellules de l'épithélium intestinal était accrue. Dans la lumière de l'intestin, l'apeline permet un transport du glucose à travers la barrière intestinale notamment en augmentant le rapport GLUT 2/SGLT-1 sur cette membrane via la phosphorylation de l'AMPK [118]. Cette action sur le métabolisme glucidique s'ajoute à la stimulation de la captation du glucose dans les muscles squelettiques.

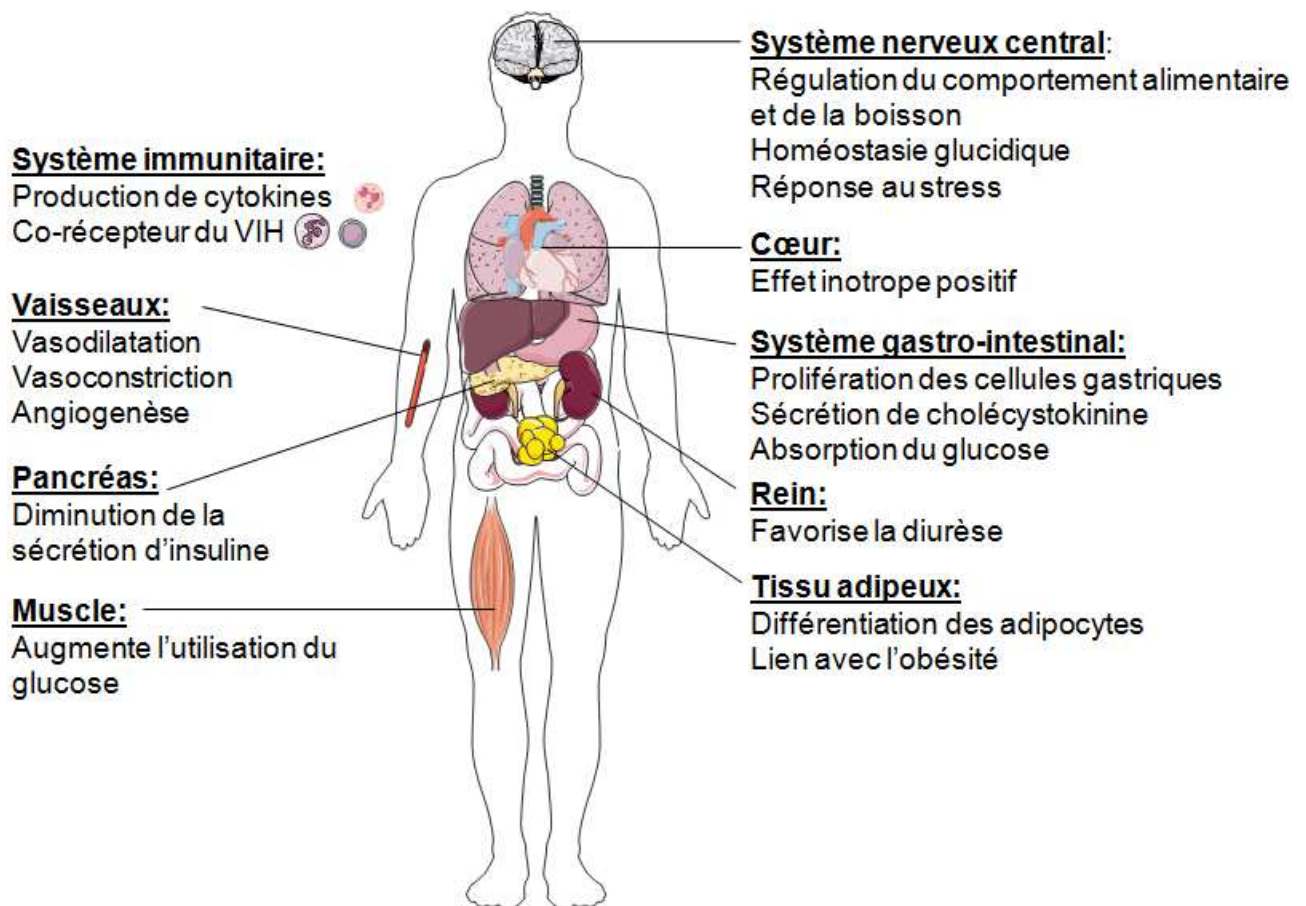


Figure 15: Vue d'ensemble des principales actions de l'apeline d'après Falcao-Pirés 2010 et Castan-Laurell 2011. Réalisé à partir de la banque d'images Servier Médical Art.

En conclusion, l'expression ubiquitaire et les actions variées de l'apeline dans l'organisme démontrent la complexité du système apelinergique. Son expression dès la vie foetale

indique que l'apeline pourrait exercer un rôle dans la programmation de pathologies métaboliques de l'adulte. En effet, les maladies métaboliques sont le résultat d'une interaction complexe entre des facteurs génétiques, physiologiques, comportementaux et des influences environnementales. De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence la relation entre les événements précoces du développement et les troubles métaboliques à l'âge adulte [119]. Les parties suivantes vont présenter ce concept qui a été abordé dans mes travaux expérimentaux au cours de cette thèse.

4. LA PROGRAMMATION FCETALE

4.1. L'hypothèse du phénotype économe

C'est par l'étude de 2 cohortes qu'en 1989 Barker *et al.* ont mis en évidence un lien entre un petit poids de naissance et une augmentation de la pression artérielle chez des enfants dès 10 ans et avec une accentuation du phénomène à l'âge de 36 ans [120]. Il aura fallu attendre l'année 1992 pour que l'association entre un faible poids de naissance et des troubles de la tolérance glucidique soit rapportée [121].

L'hypothèse de Barker et Hales du « *thrifty phenotype* » - littéralement « phénotype économe » - suppose une sensibilité du développement foetal à l'environnement utérin [122]. Dans le cadre de l'insuffisance utéro-placentaire ou plus généralement d'une sous-nutrition foetale, une adaptation physiologique se met en place chez le foetus pour favoriser la croissance de certains organes tel que le cerveau au détriment des autres tissus. Ces adaptations permettent au foetus de survivre dans ces conditions délétères mais seraient à l'origine d'altérations du métabolisme après la naissance lorsque l'enfant se retrouve dans un environnement très différent et plus favorable [122]. En accord avec cette hypothèse, un grand nombre d'études épidémiologiques et cliniques menées dans différentes populations, ont révélé une corrélation inverse entre un petit poids de naissance et une augmentation du risque de développer à l'âge adulte un syndrome métabolique (ensemble de troubles métaboliques incluant une résistance à l'insuline, une diminution du HDL-cholestérol, une hypertriglycéridémie, un surpoids abdominal, associés à une hypertension, un état inflammatoire et un état thrombotique, [122-125].

C'est dans ce contexte qu'est né le concept de la DOHaD pour « *Developmental Origins of Health and Disease* », littéralement « Les origines développementales de la santé et des maladies » [119;126].

4.2. La théorie du « mismatch » environnemental

Par la suite, la théorie du « phénotype économe » a été étendue. L'observation des femmes enceintes pendant la grande famine des Pays-Bas (1944-1945) a montré que la descendance exposée à une sous-nutrition en début de grossesse avait un risque plus important de développer une hypertension à l'âge adulte, alors qu'une sous-nutrition en fin de gestation a été associée à une augmentation de l'adiposité et une intolérance au glucose pour les fœtus exposés [122].

Cependant, les perturbations métaboliques chez le fœtus ayant subi un RCIU ne seraient retrouvées que lorsque que l'environnement postnatal serait à l'opposé de l'environnement *in utero*. En effet, l'observation des fœtus dont les mères ont subi la grande famine de Leningrad, n'a pas révélé de corrélations positives entre un petit poids de naissance et des modifications du métabolisme. La différence entre ces deux périodes critiques de l'Histoire est qu'à la fin de la famine néerlandaise, l'environnement nutritionnel a retrouvé ses richesses alors qu'à Leningrad, la sous-nutrition a été maintenue avant et après le siège de la ville.

Le fœtus adapte sa croissance en fonction de l'apport nutritionnel intra-utérin et c'est le « *mismatch* », autrement dit la « discordance », entre l'environnement pré- et postnatal qui programmerait les pathologies métaboliques tardives [119].

4.3. L'effet du « catch-up »

Certains auteurs suggèrent que la croissance rapide postnatale afin de rattraper un poids adapté à l'âge (« *catch-up growth* ») pourrait jouer un rôle prépondérant dans la programmation métabolique. En effet, il est assez fréquent qu'après un ralentissement de croissance le sujet exposé présente une accélération de croissance linéaire pour retrouver un poids et une taille adaptés à son âge.

Le « *catch-up growth* » pourrait en partie être contrôlé par le système des IGFs. Comme nous l'avons vu précédemment lors d'une malnutrition pendant la vie utérine, le fœtus adapte ses réponses hormonales suite au manque de substrat énergétique (notamment en

glucose) en limitant sa production d'insuline et en adaptant le système des *Insulin-like Growth Factors* (IGFs). Les concentrations d'IGF2 dans le sang de cordon ombilical sont positivement corrélées au poids de naissance, c'est donc en toute logique que lors d'un RCIU, la concentration plasmatique en IGF2 est réduite d'environ 30% [49]. A la suite du retour à un environnement nutritionnel riche, le système des IGFs se réactiverait provoquant alors une accélération de croissance [127]. Cette réponse a souvent lieu dans les premières années de vie, augmenterait l'adiposité (notion de « *catch-up fat* », [128] et provoquerait des modifications métaboliques qui se révéleraient pathologiques plus tardivement [129;130].

4.4. Les mécanismes de programmation fœtale

L'obésité pendant la grossesse entraîne une augmentation de la glycémie, de la leptinémie, de l'insulinorésistance hépatique et périphérique et un état inflammatoire. Tous ces facteurs pourraient contribuer à une programmation métabolique du fœtus exposé [34]. L'étude de Deierlein *et al.* menée sur 263 couples mère/enfant en 2011 a révélé que si la glycémie maternelle était supérieure à 130 mg/dL pendant la grossesse, le risque d'obésité infantile était multiplié par 2. Ainsi, les enfants nés d'une mère ayant une glycémie gestationnelle inférieure à 100 mg/dL ont à l'âge de 3 ans un IMC inférieur à ceux des mères ayant une glycémie élevée [131].

En recherche expérimentale, les études chez les rongeurs soumis à un régime hypercalorique mènent souvent aux mêmes conclusions : la descendance de mères obèses a un poids plus important et une adiposité plus élevée. Cependant, la diversité des régimes alimentaires employés dans ces études nous montrent que c'est l'obésité elle-même qui programmerait ces traits métaboliques chez la descendance [34]. Le cerveau et l'hypothalamus semblent être particulièrement vulnérables. Par exemple, des études menées chez les primates non humains nourris par une alimentation hypercalorique au cours de la gestation montrent que la descendance de mères obèses pendant la grossesse présente une augmentation fonctionnelle des voies de la mélanocortine et de la sérotonine hypothalamiques, deux systèmes neuronaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique [132;133]. Ces altérations pourraient s'ajouter à des modifications de la voie de signalisation de la leptine puisque Bouret *et al.*

ont démontré que les connexions hypothalamiques des voies de régulation de l'appétit sont dépendantes d'un pic de leptine en période postnatale (chez la souris) qui contrôle le comportement alimentaire à l'âge adulte [134].

4.5. Facteurs épigénétiques

En termes de génétique, le lien entre la croissance foetale et les pathologies de l'adulte implique souvent les gènes maternels mais la modulation de l'expression des gènes par l'environnement pourrait jouer un rôle encore plus important.

L'épigénétique est l'étude des modifications de l'expression génique induites par l'environnement à partir d'un même génotype. Les modifications épigénétiques comprennent les méthylations de l'ADN sur les couples de nucléotides Cytosine et Guanine (CpG) ; les changements de la structure de la chromatine via l'acétylation ou la méthylation des histones et les modifications post-transcriptionnelles grâce à l'action des micro-ARNs (Figure 16). Les modifications de la structure de l'ADN affectent l'expression génique et donc les fonctions physiologiques qui en découlent [119;135].

Lorsque la transcription de la séquence ADN d'un gène en ARN messager est rendue possible, on dit que la chromatine est active. Elle est caractérisée par l'absence de méthylations sur les séquences cytosine-guanine (CpG) et la présence de groupement acétyle sur des résidus lysines spécifiques des histones du nucléosome. Cela limite leur attachement à l'ADN et permet une chromatine plus « ouverte ». Les facteurs de transcriptions peuvent alors s'y fixer. Par opposition, la chromatine inactive est caractérisée par une désacétylation des histones, une méthylation des séquences CpG sur le promoteur et une diminution de la fixation des facteurs de transcription.

A un autre niveau, les microARNs qui sont des ARN comprenant 19 à 22 nucléotides peuvent se fixer de façon complémentaire à l'ARN messager transcrit dans la séquence 3' et réduire son taux de traduction en protéine (Figure 16).

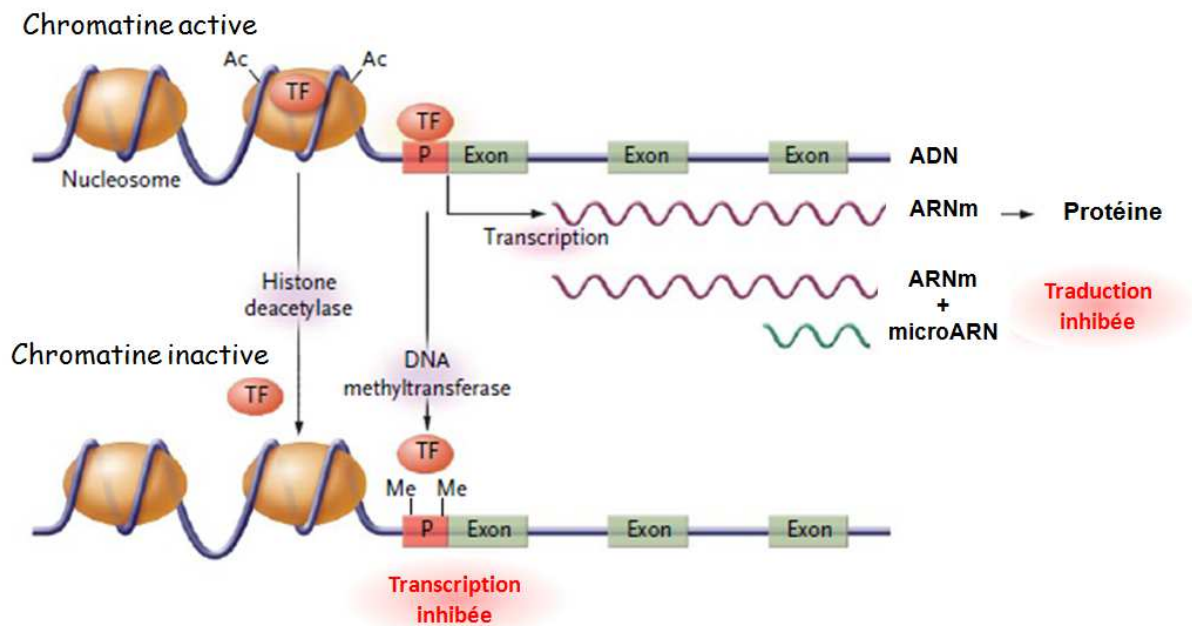


Figure 16: Régulation de l'expression des gènes par processus épigénétiques. Groupe acétyle (Ac), Facteur de transcription (TF), Région promotrice (P), Groupement méthyle (Me) d'après Gluckman et al. 2008.

Chez les Mammifères, la mère transmet les informations environnementales à l'embryon via le placenta et à l'enfant via l'allaitement [135]. Plusieurs études expérimentales ont démontré des altérations de « l'épigénome » dans différentes sortes d'études de programmation métaboliques et endocrines. Ainsi, l'exposition maternelle à un régime pauvre en protéines au moment de la conception chez la rate (E0,5 – E4,25) entraîne chez la descendance un RCIU, une accélération de croissance et une hypertension artérielle [136]. De la même façon, un stress postnatal induit par la réduction du comportement maternel au moment de la lactation chez le rat programme des modifications de l'axe corticotrope et une réponse au stress augmentée [137]. Enfin, les nouveau-nés de poids normal mais nourris avec un lait maternisé (plus riche en calories) plutôt qu'au lait maternel ont un risque plus important de devenir obèses à l'âge adulte [138]. Dans ces études, des altérations de la méthylation de l'ADN et/ou des modifications des histones ont été démontrées, ce qui implique que la « fenêtre » de susceptibilité aux modifications épigénétiques s'étalerait de la période périconceptionnelle à la période postnatale précoce [135]. A ce jour, on peut penser qu'une part importante des mécanismes de programmation métabolique passe par des

altérations épigénétiques, certains auteurs envisagent aussi que celles-ci puissent contribuer à un passage transgénérationnel des pathologies [139].

Certains gènes peuvent être soumis à un autre phénomène épigénétique : l’empreinte parentale. C’est un processus retrouvé chez les gènes de Mammifères qui implique une expression de ces gènes soit par l’allèle maternel, soit par l’allèle paternel. Ils seraient entre 100 et 500 et sont en général regroupés dans des zones sur le génome appelées *clusters*. Le placenta serait un des organes qui exprimerait le plus ces gènes soumis à l’empreinte parentale [140]. Les *clusters* de gènes sont connus pour être des zones méthylées or, après la fécondation, la méthylation de l’ADN est maintenue au cours des divisions mitotiques. Dans de rares cas, la méthylation de zones spécifiques agissant directement sur l’expression des gènes du développement embryonnaire et/ou foetal (l’expression de l’IGF2 par exemple) disparaît à des stades précoces et a des conséquences sur la croissance des foetus [141]. Des études menées en collaboration au laboratoire ont montré qu’une alimentation maternelle hyperlipidique était capable de moduler dans le placenta certains gènes soumis à l’empreinte parentale chez la souris [140], ce qui renforce le lien entre alimentation maternelle et modulation de la croissance du foetus via des mécanismes épigénétiques.

5. RETARD DE CROISSANCE & MACROSOMIE

De manière intéressante, de nombreuses données convergent vers le fait qu’un petit poids de naissance est corrélé à une augmentation du risque d’apparition du syndrome métabolique à un âge avancé mais, de manière surprenante, les enfants qui naissent avec un poids de naissance très élevé, c’est-à-dire macrosome possèdent ces mêmes risques à l’âge adulte [59]. Cela se décrit parfaitement par une courbe en U représentant les risques d’apparition de pathologies à l’âge adulte en fonction du poids de naissance (Figure 17). Il semble donc que les altérations de la croissance foetale qu’elle soit réduite ou exacerbée présentent des similitudes dans les voies biologiques impliquées dans les mécanismes de programmation de pathologies à long-terme.

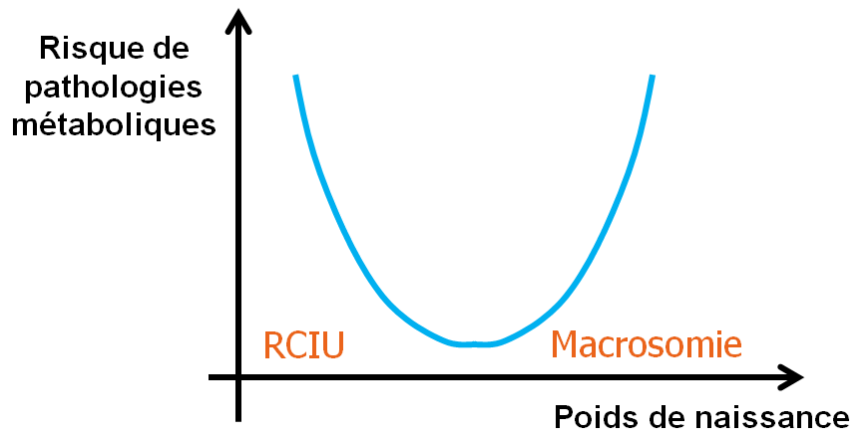


Figure 17: Représentation graphique des risques d'apparition de pathologies métaboliques en fonction du poids de naissance.

6. OBJECTIFS DE LA THÈSE

Dès la conception, l'organisme en devenir présente des caractéristiques qui dépendent de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. Les héritages génétiques maternels et paternels et l'environnement utérin (sous-nutrition, insuffisance placentaire, stress, diabète, obésité) sont les premiers facteurs pouvant programmer la croissance du fœtus. Viennent ensuite s'ajouter les facteurs environnementaux pendant la croissance précoce (allaitement maternel, nutrition) et l'environnement à l'âge adulte (nutrition, activité physique...).

Le but de nos travaux est de mieux comprendre les mécanismes anténataux impliqués dans la programmation des complications métaboliques (dues à une insuffisance placentaire ou une obésité maternelle) et de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour y remédier.

A l'aide d'un modèle animal de rate gestante avec insuffisance placentaire, nous étudierons le devenir de nouveaux-nés avec un retard de croissance intra-utérin. En parallèle nous tenterons de prévenir les complications métaboliques de l'adulte à l'aide de traitement maternel par Fasudil, un inhibiteur des Rho-kinases.

Le deuxième objectif de cette thèse est d'étudier les variations d'expression du système apelinergique dans 12 organes chez la souris obèse. Nous analyserons aussi les fluctuations de l'apelinémie au cours de la gestation chez la souris obèse.

RÉSULTATS

1. MODÈLE ANIMAL AVEC RCIU & TRAITEMENT PAR FASUDIL

1.1. Objectifs

Les modèles animaux en recherche expérimentale permettent d'apporter des informations quant aux mécanismes mis en jeu dans la programmation foetale. Dans cette partie, nous avons étudié les effets d'une insuffisance placentaire induite par une inhibition de la NO synthase chez la rate gestante (traitement par L-NAME). Nos objectifs étaient de répondre à ces différentes questions :

- ⊗ **L'insuffisance placentaire altère-t-elle la croissance des fœtus ? Les animaux exposés au L-NAME présentent-ils des troubles métaboliques à l'âge adulte ?**

Nous avons ensuite traité les rates avec insuffisance placentaire (rates L-NAME) par Fasudil, une substance vasodilatatrice qui inhibe la voie des Rho-kinases. Nous avons alors évalué les paramètres suivants :

- ⊗ **Le traitement par Fasudil permet-il une croissance normale des fœtus ? Cette amélioration précoce de l'état général fœtal prévient-elle l'apparition des troubles métaboliques tardifs ?**

1.2. Modèle animal d'insuffisance placentaire induit par une inhibition des NO synthases

1.2.1. L-NAME et gestation

1.2.1.1. L'inhibition compétitive

La prééclampsie affecte 5 à 8 % des grossesses et correspond à une hypertension artérielle maternelle associée à une protéinurie et des œdèmes [18]. De nombreux modèles animaux existent pour mimer l'insuffisance placentaire associée au syndrome prééclamptique. Le modèle animal choisi par Altun *et al.* en 2008 implique une exposition à un stress sonore entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour de gestation. Les rates gestantes sont alors hypertendues (142 mmHg vs 78 mmHg pour le groupe contrôle), et présentent

une protéinurie 4 fois plus importante que celle des rates gestantes contrôles ainsi qu'une concentration d'ADMA (diméthylarginine asymétrique) largement supérieure (7 fois augmentée) [142]. Les méthylarginines (dont l'ADMA et le L-NAME -N- ω -nitro-L-Arginine méthyl ester- font partie) inhibent la production de NO par les NOS grâce à une inhibition compétitive [56].

En se basant sur ces données, ces auteurs ont choisi de supplémenter les rates gestantes prééclampsiques avec de la L-Arginine (précurseur du NO) par voie orale à une dose de 21 mg/kg entre les 18 et 19^{ème} jours de gestation (E18 et E19). Les mesures effectuées à E20 et E21 ont montré que l'apport de L-Arginine normalisait la pression artérielle, la protéinurie et les concentrations plasmatiques d'ADMA maternels; laissant supposer une implication de cette voie dans l'établissement de la prééclampsie [142;143].

1.2.1.2. Les observations cliniques

L'utilisation du L-NAME pour mimer un syndrome prééclampsique a débuté en 1993 avec Yallampalli et Garfield. Le NO semble jouer un rôle essentiel dans la mise en place de la prééclampsie et son inhibition par le L-NAME provoque une hypertension artérielle et une protéinurie maternelles, et chez la descendance un RCIU [144-146]. Les protocoles expérimentaux peuvent varier en termes de début du traitement et de mode d'administration du L-NAME. Une implantation sous-cutanée de pompes osmotiques à E10 [143;146] ou l'ajout de L-NAME dans l'eau de boisson de E1 à E18 [147] apportent des conclusions similaires. L'étude de Fernandez *et al.* décrit une analyse de la cinétique des effets du L-NAME à 50 mg/kg/jour. A E6 les auteurs ont noté un nombre réduit de sites d'implantations embryonnaires chez les rates gestantes L-NAME alors qu'en fin de gestation (à E18) ils ont montré que l'inhibition de la production de NO entraînait : une diminution de la taille de la portée, de celle des fœtus et des placentas avec un poids réduit [147]. De manière intéressante, cette étude révèle l'apparition de nécroses des membres appelées "résorptions fœtales" allant jusqu'à 3 par portée alors qu'aucunes anomalies n'étaient observées chez les animaux contrôles. Cette donnée vient en confirmation à l'étude de Lubarsky *et al.* qui obtient le même résultat avec un traitement par L-NAME de E5 à E21 dans l'eau de boisson [148].

D'autre part, lorsque le traitement débute en fin de gestation (E17), un certain nombre de fœtus sont mort-nés et, dans cette étude, cet effet est proportionnel à la dose de L-NAME distribuée [144].

1.2.1.3. Les modifications métaboliques

Osol *et al.* ont inhibé la NO synthase pendant la gestation chez la rate et ont révélé que l'inhibition de la voie du NO par le L-NAME diminuait considérablement le diamètre des artères utérines principales. Le NO semble jouer un rôle dans le remodelage des artères utérines pendant la gestation et ceci indépendamment de l'hypertension secondaire provoquée par le L-NAME car l'ajout d'hydralazine au traitement (qui permet de normaliser la pression artérielle) n'a pas modifié le résultat observé [149].

L'augmentation de la pression artérielle induite par le L-NAME ne serait pas uniquement due à une inhibition de la production de NO, en effet, d'autres facteurs vasoconstricteurs pourraient aussi intervenir. C'est le cas de l'endothéline-1 dont la concentration plasmatique est augmentée par 11 jours de traitement par L-NAME chez des rates gestantes et non gestantes [150]. En outre, l'utilisation d'un antagoniste du récepteur de l'endothéline conjointement à l'exposition au L-NAME (BQ123 1mg/jour en fin de gestation) diminue partiellement l'hypertension artérielle retrouvée dans le groupe de rates gestantes avec L-NAME [151].

L'angiotensine II pourrait aussi jouer un rôle dans l'hypertension artérielle provoquée par l'inhibition non sélective des enzymes de type NOS. Ainsi, le L-NAME provoque une hypertension chez les rates qu'elles soient gestantes ou non, mais augmente la réponse à l'angiotensine II chez les rates gestantes uniquement [148].

Dans ce modèle expérimental, des auteurs ont alors recherché des moyens thérapeutiques afin d'amoindrir les conséquences materno-foetales de la prééclampsie. Le choix principal de traitement de cette pathologie s'est alors logiquement porté sur l'utilisation de divers vasodilatateurs. Le CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*) connu pour être un puissant vasodilatateur [152] administré à une dose de 1 µg/h à l'aide de pompes osmotiques du 17^{ème} jour de gestation jusqu'à la mise bas a permis de limiter l'élévation de la pression artérielle maternelle et de diminuer le taux de mortalité foetale [21]. Ceci apporte deux informations : 1) le CGRP agit par une voie indépendante du NO et 2) l'utilisation d'un vasodilatateur dans ce modèle L-NAME permet d'en atténuer les effets délétères. Nous pouvons donc en conclure que l'utilisation de vasodilatateurs indépendants de la voie du NO semble intéressante en thérapeutique dans ce modèle

expérimental. Dans ce mémoire, je présenterai dans une deuxième partie des résultats concernant l'utilisation du Fasudil (inhibiteur des Rho-kinases) dans cette problématique.

1.3. Effet à court et à long terme

L'insuffisance placentaire est retrouvée dans le syndrome prééclampsique, cependant il est toujours difficile de déterminer si elle est la cause ou la conséquence de cette pathologie. C'est pourquoi la recherche dans ce domaine nécessite des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* pour mieux comprendre les mécanismes menant à l'insuffisance placentaire et tenter d'améliorer les thérapeutiques existantes ou d'en établir de nouvelles plus appropriées.

Comme décrit précédemment, la voie du NO semble impliquée dans l'établissement de la prééclampsie et un modèle animal a été développé en 1993 pour en mimer les symptômes : le modèle L-NAME [144;145].

Bien que ce modèle soit utilisé depuis 20 ans environ, très peu d'études ont été menées sur la descendance exposée au L-NAME *in utero*. Il a été clairement établi qu'un traitement par L-NAME (souvent 50 mg/jour) retarde la croissance des fœtus. Nous avons donc choisi, en accord avec l'hypothèse de programmation foetale d'étudier les rats mâles nés de mères traitées par L-NAME pendant les 5 derniers jours de gestation.

Notre premier questionnement a été le suivant : **les rats L-NAME développent-ils des pathologies métaboliques à l'âge adulte ?**

Pour tenter de répondre à cette question nous avons suivi l'évolution de la masse corporelle des rats exposés au L-NAME *in utero*, nous avons évalué leur comportement alimentaire, leur tolérance au glucose à l'âge de 3, 6 et 9 mois, et des paramètres biologiques et morphologiques ont été analysés à l'âge de 9 mois.

Article n°1: “Maternal hypertension induced by NO blockade does not program adult metabolic diseases in growth-restricted rat fetuses”,
Metabolism, 2012

Cette étude a montré qu'un traitement maternel par le L-NAME, un inhibiteur de la NO synthase endothéliale pendant les 5 derniers jours de gestation retardait la croissance des fœtus d'environ 20 % et qu'il pouvait causer des nécroses aux membres.

Les rats L-NAME retrouvaient le poids moyen des rats contrôles dès 10 jours de vie. Ils présentaient une meilleure tolérance au glucose avec, nous le supposons, une meilleure sensibilité à l'insuline à l'âge de 3 mois (glycémie et insulinémie plus basses 30 minutes après le bolus de glucose). Ce résultat n'était plus retrouvé à 6 et 9 mois.

La prise alimentaire des rats L-NAME âgés de 9 mois était légèrement augmentée en période diurne, sans impact majeur sur la prise alimentaire totale (moyenne calculée sur 24 heures) et nous n'avons pas retrouvé de modifications de l'expression génique hypothalamique du neuropeptide Y (NPY, peptide orexigène) et de la proopiomélanocortine (POMC, précurseur de l' α -MSH, peptide anorexigène). En revanche, l'expression génique de l'*uncoupling protein-1* (UCP-1) est considérablement augmentée dans le tissu adipeux brun, qui lui, est en moins grande quantité chez les animaux L-NAME que chez les rats contrôles.

De plus, nous avons noté une hyperinsulinémie modérée à l'âge du sacrifice (9 mois), et des concentrations de cholestérol et triglycérides plus basses chez les rats avec RCIU.

Cet article est l'un des rares, à notre connaissance, qui a étudié la descendance exposée à une inhibition de la NO synthase *in utero*. Jusqu'alors nous savions que les rats L-NAME ne présentaient pas de modifications des paramètres hémodynamiques et étaient moins fertiles que des animaux témoins à l'âge de 3 mois [153]. Nous pouvons maintenant ajouter que les rats L-NAME ne présentent pas de troubles métaboliques marqués à l'âge adulte, néanmoins certains traits métaboliques semblent se dessiner.

* Le métabolisme glucidique semble atteint puisqu'une meilleure tolérance au glucose à l'âge de 3 mois a été observée. Cet effet a déjà été retrouvé chez des souris de 8 semaines issues de mères soumises à une restriction protéique pendant la gestation [154]. Cependant, ce résultat qui semble bénéfique à un stade précoce peut se transformer en troubles de la tolérance glucidique plus tardivement comme l'ont montré certains auteurs chez des rats âgés de 15 mois [129]. Ce résultat semble cohérent avec nos données puisqu'à l'âge de 9 mois, les rats L-NAME avaient de plus fortes concentrations

d'insuline plasmatique que les rats témoins et que le calcul de l'HOMA-IR (un marqueur d'insulinorésistance) était significativement augmenté chez les animaux L-NAME ($3,83 \pm 0,72$ versus $6,04 \pm 0,56$, $P < 0,05$). Afin de savoir si ces observations sont les prémises d'un trouble de la tolérance glucidique il aurait probablement fallu étudier nos animaux à un âge plus tardif. Néanmoins, nous pouvons conclure que l'exposition *in utero* au L-NAME n'affecte pas fortement l'homéostasie glucidique à long terme.

* Concernant la croissance, celle-ci n'est pas accélérée chez les animaux L-NAME. Malgré le RCIU et le « *catch-up growth* » observés en période périnatale, à l'âge de 9 mois les rats L-NAME ont un poids similaire à celui des animaux contrôles. Pourtant, une légère hyperphagie a été rapportée et la quantité de tissu adipeux brun était diminuée (organe connu pour augmenter la dépense énergétique en particulier grâce à la thermogénèse). L'étude des principaux peptides orexigène (NPY) et anorexigène (POMC) n'a pas révélé de modifications de l'expression génique de ces régulateurs de l'appétit dans l'hypothalamus chez les rats L-NAME âgés de 9 mois. De nombreux autres facteurs pourraient intervenir pour modifier la prise alimentaire tels que la ghréline, le CART (*Cocaine and Amphetamine Related Transcript*) ou encore l'AgRP (*Agouti Related Peptide*) mais leur expression génique n'a pas été mesurée.

En revanche, l'expression de l'UCP-1 était augmentée de 75 % chez les animaux L-NAME. Ce résultat pourrait refléter une activité accrue du tissu adipeux brun, possiblement pour compenser la faible quantité de ce tissu chez les animaux exposés à l'inhibition de la NO synthase *in utero*. Il reste à expliquer pourquoi ce tissu présente spécifiquement ces altérations. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le L-NAME puisse *in utero* altérer spécifiquement la lignée des adipocytes bruns ou encore que ce composé, indirectement, en réduisant la vascularisation de ce tissu, puisse en réduire son développement durant les phases précoces de sa mise en place. L'altération de la vascularisation par le L-NAME est d'ailleurs proposée par certains auteurs pour expliquer les nécroses de membres et de la queue de certains nouveau-nés L-NAME (non utilisés ici) [147].

Pour conclure, nous avons montré que l'hypertension artérielle maternelle en fin de gestation induite par une inhibition de la NO synthase est responsable d'un retard de croissance intra-utérin chez la descendance mâle exposée mais qu'en conditions basales

(régime alimentaire standard), les animaux L-NAME ne présentaient pas de troubles métaboliques marqués. Une étude expérimentale plus longue et/ou un apport énergétique plus important (régime alimentaire hypercalorique) pourraient peut-être accentuer certains des traits métaboliques observés.

1.4. Tentative de déprogrammation

Sur la base des données actuellement disponibles, il résulte que la vasoconstriction jouerait un rôle central dans l'apparition du syndrome prééclamptique [155]. La vasoconstriction implique en premier lieu deux protéines : l'actine et la myosine dans le muscle lisse. Suite à l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) phosphoryle la myosine. Il se forme alors des liaisons entre l'actine et la myosine, la contraction est rendue possible et cela génère une vasoconstriction. A l'inverse, la vasodilatation, elle, est mise en place par une déphosphorylation de la myosine par la phosphatase des chaînes légères de myosine ou MLCP. Un équilibre entre ces deux phénomènes moléculaires permet un contrôle fin de la vasomotricité. Lors de la vasoconstriction, lorsque la voie du calcium s'épuise, d'autres voies moléculaires sont mises en jeu comme la voie des Rho-kinases. Celle-ci implique une enzyme de type GTPase nommée Rho A, et ses effecteurs les Rho-kinases 1 et 2 (ROCK 1 et 2). Les Rho-kinases inhibent la relaxation des muscles lisses en phosphorylant la MLCP qui, sous sa forme phosphorylée, est rendue inactive (Figure 18) [24]. Les Rho-kinases interviennent aussi dans d'autres phénomènes tels que l'adhésion et la prolifération cellulaire, la phagocytose ou encore l'apoptose [26].

Enfin, des études cliniques ont montré que dans certaines pathologies comme l'hypertension et la prééclampsie cette famille de protéines est affectée [22].

Le Fasudil est un inhibiteur spécifique des Rho-kinases. Il est métabolisé en hydroxy-Fasudil par le foie et empêche la phosphorylation de la MLC par les Rho-kinases 1 et 2. Par ces mécanismes, il favorise la vasodilatation (Figure 18). En clinique, le traitement par le Fasudil a déjà montré des effets bénéfiques pour des pathologies d'origine vasculaire, notamment dans le cadre du traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire mais aussi pour la prévention de vasospasmes cérébraux [26]. Cependant, le Fasudil n'a encore jamais été utilisé dans le cadre de grossesses pathologiques. Par ses

vertus vasodilatatrices, il pourrait donc potentiellement représenter un outil novateur dans l'élaboration d'un traitement de la prééclampsie.

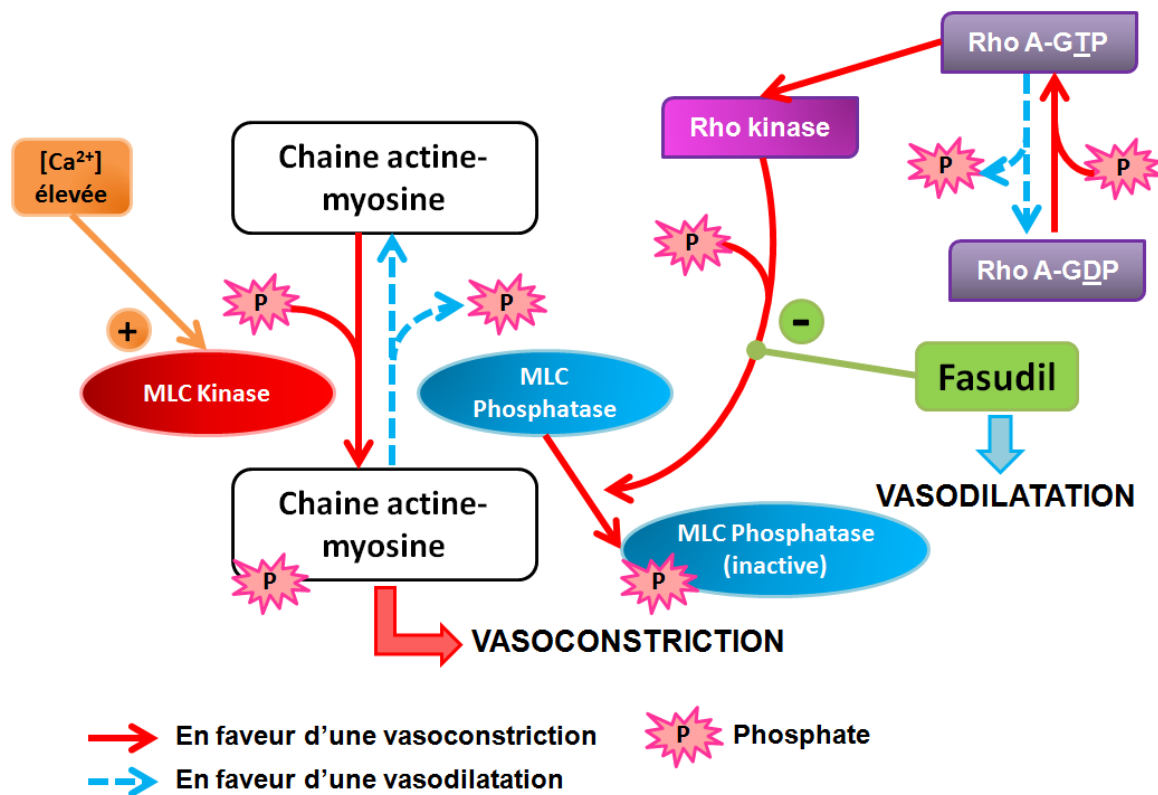


Figure 18: Représentation schématique de la régulation de la contraction des muscles lisses des vaisseaux par la voie des Rho-kinases et le Fasudil. MLC : Chaîne légère de myosine. GDP : Guanosine Diphosphate, GTP : Guanosine Triphosphate. Lorsque la concentration intracellulaire en calcium est élevée, la MLC kinase phosphoryle les chaînes actine-myosine et permet la vasoconstriction. Pour un retour à un état normal, la MLC phosphatase déphosphoryle les chaînes actine-myosine. Lorsque la voie du Calcium s'épuise, la voie des Rho-kinases prend le relais. En phosphorylant la MLC Phosphatase, la Rho-kinase la rend inactive et permet donc le maintien de la vasoconstriction. Cette action est inhibée par le Fasudil, qui a donc un rôle vasodilatateur. D'après Tawara et al., 2006.

Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier les conséquences à court et long terme d'un traitement maternel par Fasudil (10 mg/jour) chez la rate gestante.

Notre questionnement a été le suivant : **l'inhibition des Rho-kinases par le Fasudil améliore-t-elle les conséquences métaboliques induites par le L-NAME chez le fœtus et l'adulte?**

Article n°2: “Prenatal Fasudil exposure alleviates fetal growth but programs hyperphagia and overweight in the adult male rat” *European Journal of Pharmacology*, 2012

Dans cette étude, le traitement maternel par Fasudil améliore la croissance fœtale des rats L-NAME mais provoque un surpoids, des troubles de la tolérance glucidique, et une augmentation de la prise alimentaire chez la descendance exposée.

Le Fasudil est connu pour ses propriétés vasodilatatrices mais en plus de ces effets sur les vaisseaux, l'inhibition des Rho-kinases peut améliorer le métabolisme glucidique et le métabolisme lipidique des animaux traités. En inhibant les Rho-kinases, le Fasudil atténue la phosphorylation sur le résidu serine³⁰⁷ de l'IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate 1*) et améliore le métabolisme glucidique chez des rats Zucker [156]. Il limite l'hypertrophie adipocytaire chez des souris obèses soumises à un régime hypercalorique pendant 12 semaines et réduit leur résistance à l'insuline [157].

Nos résultats démontrent que l'inhibition des Rho-kinases en fin de gestation programme le comportement alimentaire de la descendance mâle exposée au traitement maternel. Nous avons supposé que les connexions neuronales hypothalamiques régulant la prise alimentaire étaient altérées par le Fasudil. Le Fasudil est une petite molécule (327 Da) et l'hydroxy-Fasudil, sa forme active après avoir été métabolisé par le foie pourrait potentiellement traverser la barrière hémato-placentaire (N.B. : le Fasudil est déjà utilisé en clinique pour le traitement de vasospasmes cérébraux, son passage à travers la barrière hémato-encéphalique a été prouvé, [158]).

Comme Bouret *et al.* l'ont démontré, les connexions neuronales se font en période post-natale précoce (jusqu'à P12) chez le rat [134]. Au cours de l'établissement de ces connexions, la leptine joue un rôle essentiel. La concentration en leptine varie chez le rat pendant la période de lactation jusqu'à entraîner un pic à P7-P10 [159] qui semble indispensable à la mise en place correcte des projections neuronales hypothalamiques. Nos animaux des groupes Fasudil et L-NAME+Fasudil présentaient une surexpression du peptide orexigène NPY dans l'hypothalamus à l'âge de 9 mois. Nous avons donc choisi d'analyser lors d'une deuxième étude la concentration en leptine plasmatique chez les rats mâles exposés au traitement maternel par Fasudil pendant les 5 derniers jours de la gestation. Les rats Fasudil étaient en surpoids dès 2 jours de vie (données non présentées), et les dosages de leptine plasmatique à P10 et P14 ont révélé une tendance à la diminution chez les animaux du groupe Fasudil (Figure 19).

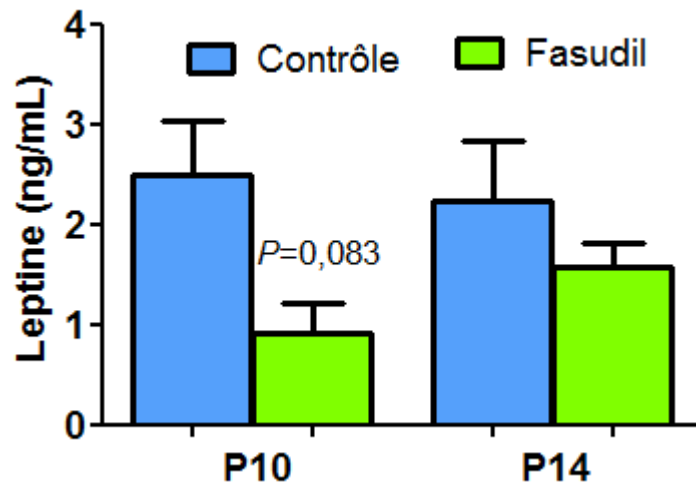


Figure 19: Concentrations en leptine plasmatique chez les rats contrôles (en bleu) et Fasudil (en vert) à 10 jours (P10) et 14 jours (P14), n=10/groupe.

A l'âge d'un mois, les rats Fasudil ne montraient pas de variation significative d'expression génique hypothalamique des principaux peptides orexigènes (NPY/AgRP) et anorexigènes (POMC/CART), ni de celles des récepteurs de la leptine et de l'insuline (Figure 20).

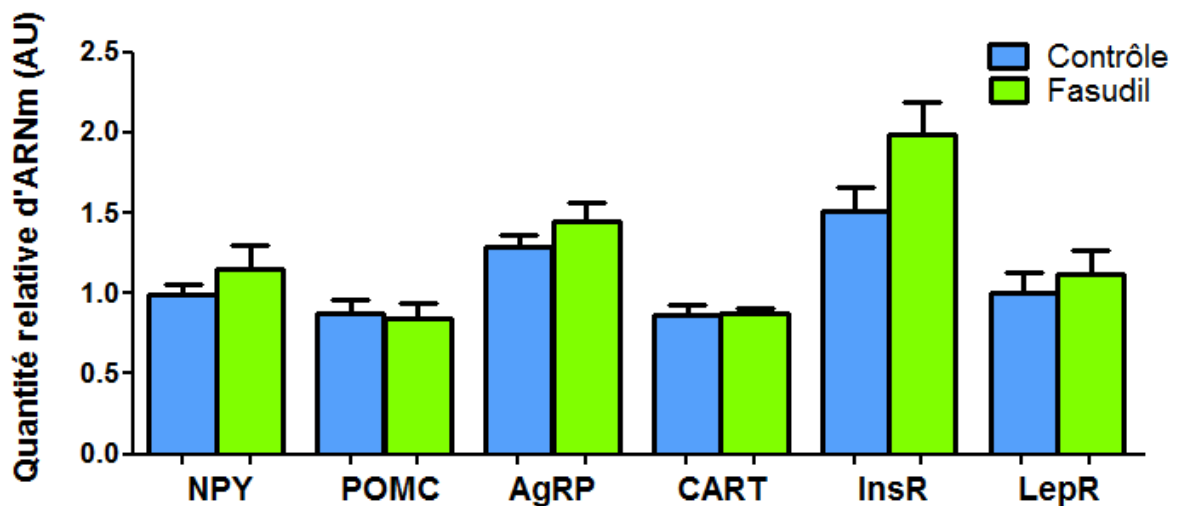


Figure 20: Expressions hypothalamiques des gènes NPY, POMC, AgRP, CART et des récepteurs à l'insuline (InsR) et à la leptine (LepR) chez des rats contrôles (en bleu) et Fasudil (en vert) âgés d'1 mois.

En conclusion, les Rho-kinases interviennent de façon certaine sur les fonctions métaboliques de l'organisme et, une exposition *in utero* à une inhibition des Rho-kinases, programme le fœtus à un surpoids, une intolérance au glucose modérée et à une hyperphagie. En lien avec les analyses complémentaires rapportées ci-dessus, il semble peu vraisemblable que l'hyperphagie programmée chez l'adulte par Fasudil implique des altérations marquées du pic de leptine en période postnatale précoce. Toutefois, au vu du phénotype des animaux Fasudil, il semble que l'hypothalamus soit particulièrement vulnérable à l'inhibition des Rho-kinases en fin de gestation.

Bien que le RCIU soit retrouvé de façon fréquente dans les services de maternité, les données mondiales sur l'obésité, en particulier chez la femme, montrent que sa prévalence augmente chaque année. Les équipes d'obstétriciens sont, par conséquent de plus en plus confrontés à des femmes enceintes obèses et il est important que la recherche expérimentale puisse apporter des informations sur les mécanismes qui ont lieu *in utero* pour les fœtus lors d'une grossesse avec obésité et/ou diabète.

Les données sur le retard de croissance induit par l'inhibition de la NO synthase et l'implication des Rho-kinases dans le métabolisme de la descendance ont apporté de nouvelles informations sur la programmation foetale de la descendance chez le rat mâle. Néanmoins, nous savons maintenant que les complications métaboliques tardives observées après RCIU sont très proches de celles observées lorsqu'il y a son phénotype inverse, c'est-à-dire une macrosomie. Parmi les nombreux agents capables d'induire une programmation métabolique, certaines hormones ont été mises évidence. A ce jour, les hormones glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez les rongeurs) sont reconnues pour être de puissants agents programmeurs sur, par exemple, les cellules β pancréatiques [160] ou sur le métabolisme énergétique dans sa globalité [161]. Jarvie *et al.* émettent l'hypothèse que l'accumulation de dépôts adipeux dans les zones centrales du corps de la femme enceinte obèse aboutirait à une lipotoxicité avec altération du transport et du métabolisme des lipides ainsi qu'une réduction des fonctions endothéliales. Cette lipotoxicité pourrait alors être à l'origine d'une insuffisance placentaire ou encore d'un transport accru de lipides vers le fœtus [162]. Dans un contexte d'obésité maternelle, on peut imaginer que les adipokines puissent être impliquées dans des dysfonctionnements fœto-maternels. L'étude de la leptine dans cette situation a déjà apporté certaines réponses [44;115] ; mais d'autres hormones pourraient être impliquées. Pour la suite de ce travail nous nous sommes particulièrement intéressés à une hormone qui semble jouer un rôle dans la grossesse, dans l'obésité et dans le transport des nutriments et qui appartient à la famille des adipokines : l'apeline. Bien que très peu de données soient à ce jour disponible sur cette hormone en période périnatale, nous avons mis en évidence récemment (Article n°4 en annexe) que le système apelinergique est fortement exprimé dans l'unité fœto-placentaire et qu'une hypertension artérielle maternelle (modèle L-NAME) est capable de moduler l'expression de l'apeline et celle de son récepteur chez le fœtus et dans le placenta. Ces données suggèrent un rôle

fonctionnel dès la vie foetale de ce système qui semble très sensible à des modifications physiopathologiques chez la mère. *In fine*, nous envisageons que cette hormone puisse être impliquée dans des altérations placentaires, foetales et à long terme chez la descendance en condition d'obésité maternelle.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier les modifications du système apelinergique (apeline/APJ) dans un nouveau modèle animal de souris femelles obèses car il n'existe aucune étude de ce système chez des rongeurs femelles à l'heure actuelle. Des souris C57Bl/6J ont été soumises à un régime hypercalorique pendant plusieurs semaines, les rendant ainsi obèses et intolérantes au glucose. Nous avons alors étudié le système apelinergique (apeline/APJ) dans plusieurs tissus. Cette étude préliminaire nous a permis dans un deuxième temps de nous intéresser aux variations de l'apeline au cours de la gestation associée à une obésité chez la souris.

2. MODELE ANIMAL D'OBESITE

2.1. Objectifs

L'obésité est une épidémie grandissante dans le monde entier, les femmes sont plus fréquemment touchées que les hommes et plus particulièrement les femmes en âge de procréer. Par ce fait, les cliniciens sont de plus en plus souvent confrontés au suivi de grossesses chez des patientes obèses.

L'obésité est définie par une augmentation de l'adiposité qui présente un risque pour la santé de l'individu. Le tissu adipeux est un tissu endocrine qui produit des hormones appelées adipokines dont l'apeline fait partie. Dans cette étude, nous avons souhaité étudier l'impact de l'exposition à un régime hypercalorique dans un modèle animal de souris en tentant de répondre aux questions suivantes :

- ⊗ **L'obésité modifie-t-elle l'expression de l'apeline et de son récepteur APJ ?**
- ⊗ **Quelles sont les variations de l'apelinémie en cas d'obésité et de grossesse associée à l'obésité ?**

2.2. Introduction sur les modèles murins d'obésité

La recherche expérimentale s'est souvent appuyée sur des modèles *in vitro* pour comprendre les mécanismes à l'origine de certaines pathologies mais pour obtenir une vision d'ensemble des compensations physiologiques suite à une maladie métabolique telle que l'obésité, c'est l'étude *in vivo* qui prédomine. Pour cela, de nombreuses souches de rongeurs, mais aussi certaines espèces de brebis, de porcs ou de singes ont été développées et mises à la disposition des équipes de recherche afin d'établir des stratégies thérapeutiques adaptables à l'Homme par la suite.

2.2.1. Les modèles génétiques

Les modèles animaux d'obésité impliquant une mutation génétique sont principalement développés chez les rongeurs. Chez la souris, la mutation du gène *agouti* (souris agouti A^y), la mutation du gène codant la leptine, une hormone peptidique produite par le tissu

adipeux qui contrôle les réserves de graisse et le comportement alimentaire [163], (souris *ob/ob* pour « obèse ») ou de son récepteur (souris *db/db* pour « diabète ») mènent toutes à une obésité, une intolérance au glucose et un diabète associé. Plusieurs souches de rats développent elles aussi une obésité : les rats Zucker *fa/fa* sont hyperphagiques et obèses suite à une mutation du gène du récepteur de la leptine alors que les rats Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) deviennent spontanément diabétiques [164].

Ces modèles sont des outils intéressants pour étudier les paramètres impliqués dans l'établissement de l'obésité et du diabète et donc dans les pathologies associées comme les troubles cardiovasculaires ou respiratoires et les cancers. Néanmoins, les mutations du gène de la leptine chez l'Homme sont rares et l'étude de modèles animaux d'origine génétique n'est peut-être pas la plus représentative des événements qui interviennent dans l'espèce humaine.

2.2.2. Le régime hypercalorique

L'obésité est le résultat d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Pour tenter de reproduire ce déséquilibre, un régime alimentaire enrichi en graisses et en hydrates de carbone a été donné à des souris pour qu'une obésité s'installe. C'est en 1988 que l'équipe de Surwit *et al.* a soumis des souris C57Bl/6J à un régime hypercalorique et a montré leur susceptibilité à ce genre d'alimentation. Après 6 mois de régime hyperlipidique (35% de lipides), en comparaison à des souris de souche A/J, les souris C57Bl/6J sont obèses et diabétiques avec des valeurs de glycémies supérieures à 240 mg/dL et des valeurs d'insulinémies supérieures à 150 μ U/mL [165].

Les rats Long Evans et Sprague Dawley seraient eux aussi sensibles au régime alimentaire hypercalorique [164]. Cependant, les souris consanguines C57Bl/6J exposées à un régime hypercalorique sont devenues un modèle animal de choix pour l'étude des pathologies métaboliques et notamment dans le cadre du diabète de type 2 [166].

2.3. Souris obèses et expression du couple apeline/APJ

Grâce à son expression dans de nombreux organes, le couple apeline/APJ est impliqué dans de multiples fonctions physiologiques (fonction cardiaque, métabolisme glucidique, homéostasie des fluides corporels...).

Dans cette étude, nous avons évalué les variations du système apelinergique en fonction :

- du cycle œstral chez les souris femelles,
- de l'état nutritionnel pour connaître l'effet du jeûne sur l'apelinémie,
- du sexe des sujets étudiés,
- du rythme circadien avec une étude menée sur 24 heures.

∅ Notre premier objectif était **de déterminer de nouveaux facteurs pouvant modifier le système apelinergique chez la souris.**

Puis nous avons choisi de mesurer l'expression génique de l'apeline et de son récepteur APJ par qRT-PCR dans 12 tissus chez la souris femelle obèse. Les données actuelles montrent que l'obésité et le diabète peuvent moduler l'apelinémie et qu'un traitement par apeline pourrait améliorer l'état général des animaux qui ont développé une obésité sévère après exposition à un régime hypercalorique pendant plusieurs mois [88;93;167]. Cependant, puisque le couple apeline/APJ est exprimé de manière importante dans l'organisme, pouvoir cibler les organes les plus touchés par l'obésité serait un réel plus pour le développement des thérapeutiques.

∅ Notre second objectif était de montrer **comment l'obésité module l'expression du système apelinergique dans 12 organes chez la souris femelle.**

Article n°3: “The apelinergic system: Sexual dimorphism and tissue-specific modulations by obesity and insulin resistance in female mice”
Peptides, 2013

Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de variations significatives de l'apelinémie en fonction du rythme circadien ou du cycle œstral et qu'il n'y a pas de dimorphisme sexuel associé au système apelinergique.

Un apport alimentaire enrichi en graisse a rendu les souris femelles obèses et intolérantes au glucose avec une intolérance à l'insuline. Le test de tolérance à l'insuline apporte plusieurs informations : dans un premier temps, l'injection d'insuline entraîne une hypoglycémie, puis des mécanismes internes prennent le relai (30 min après l'injection environ) pour augmenter la glycémie et retrouver un état normal. Les hormones impliquées seraient en majorité le cortisol, l'hormone de croissance et le glucagon [168]. Dans notre étude, la pente des valeurs de glycémie observée entre le moment de l'injection d'insuline et la glycémie 60 minutes plus tard est légèrement plus faible pour le groupe de souris soumises au régime hypercalorique. Les souris obèses ont donc une sensibilité à l'insuline plus faible que les souris du groupe contrôle. En outre, le retour à l'état basal est beaucoup plus rapide pour le groupe High Fat que pour le groupe témoin. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'axe corticotrope et l'axe somatotrope entraînent une réponse plus rapide à l'hypoglycémie dans notre groupe expérimental.

L'analyse de l'expression génique de l'apeline et de son récepteur dans 12 organes, nous a permis d'observer que la quantité d'ARN messager varie considérablement d'un organe à l'autre. Comme d'autres auteurs l'avaient déjà noté [72;95], les tissus les plus riches en apeline sont le poumon, le rein et l'hypothalamus.

De plus, malgré une absence de modification de l'apelinémie, une diminution de l'expression génique de l'apeline dans le tissu adipeux brun (-50%), dans le foie (-75%) et le rein (- 40 %) a été retrouvée chez les souris obèses alors qu'il y avait une augmentation de l'expression de l'APJ dans le tissu adipeux périrénal (+ 160%). Ceci suggère que les concentrations d'apeline circulante ne semblent pas être un marqueur efficace pour refléter les événements se produisant dans chaque organe en cas d'obésité. Nous pouvons aussi constater que l'apelinémie chez la souris femelle n'est pas un bon marqueur de l'adiposité à l'instar de la leptine, une autre adipokine [62].

Chaque organe étudié a révélé une présence du peptide et de son récepteur, ce qui laisse penser à une action autocrine et/ou paracrine de ce système comme il l'a été montré pour la sécrétion de l'ACTH (hormone corticotrope) induite par l'apeline [169].

En conclusion, l'obésité induite par l'exposition à un régime hypercalorique chez la souris modifie l'expression du système apelinergique dans certains organes (tissu adipeux, foie et reins). Ceci pourrait en faire des cibles spécifiques pour le développement de thérapeutiques dans le traitement pharmacologique de l'obésité.

2.4. Souris obèses, apeline et gestation

2.4.1. L'évolution de l'apelinémie au cours de la gestation

L'état gestationnel entraîne de nombreuses modifications métaboliques : une diminution de la sensibilité à l'insuline, une hyperlipidémie transitoire et une augmentation du stress oxydatif [43]. Dans une étude de 2011, des auteurs se sont intéressés aux modifications des concentrations d'apeline plasmatique à la 28^{ème} semaine de grossesse. Les femmes enceintes ont une apelinémie inférieure à celle des femmes contrôles (baisse de 10% des concentrations circulantes, [64]). L'apeline est exprimée dans le placenta [72] mais en cas d'hypertension artérielle (en cas de prééclampsie par exemple) pendant la grossesse, l'expression placentaire d'apeline est considérablement diminuée (environ 60 %, [170]) et les concentrations d'apeline circulante dans le sang maternel sont diminuées [171]. L'apeline est fortement exprimée dans la glande mammaire [172;173]. L'apelinémie maternelle est inférieure à l'apelinémie foetale (mesurée à partir de sang de cordon ombilical) au moment de la naissance. Chez le nouveau-né, le tissu adipeux ne serait pas la principale source d'apeline, elle proviendrait plutôt du placenta [113]. En effet, l'apeline est 10 fois plus exprimée dans le placenta que dans le tissu adipeux [174].

Les variations de l'apelinémie pendant la gestation ont été étudiées chez le rat. Les données révèlent une baisse de l'apelinémie à E22 qui correspond à la date du terme chez la rate, qui pourrait être due à une augmentation de la clairance de l'apeline. L'ACE 2 (*Angiotensin-Converting Enzyme 2*) est une enzyme capable de dégrader l'apeline et son activité placentaire est doublée en fin de gestation [172].

En résumé, l'apelinémie serait diminuée par la grossesse [64;172] et plus encore par l'hypertension associée à la grossesse [171]. Ces modifications se retrouveraient aussi dans le placenta [170;175]. L'apeline ayant un rôle pro-angiogénique et hypotenseur, ces résultats vont dans le sens des symptômes observés dans cette pathologie de la grossesse. Néanmoins, Cobellis *et al.* ont observé une augmentation de l'apeline placentaire et de son récepteur en cas de prééclampsie. Leur hypothèse étant que cette surexpression pourrait s'opérer pour compenser les perturbations vasculaires liées au syndrome prééclampsique [176]. Ces données restent confuses et incomplètes, par exemple on ne connaît pas à ce jour l'évolution fine de l'apelinémie maternelle tout au long de la grossesse normale ou pathologique. De même, le rôle du système apelinergique dans le placenta et chez le fœtus reste peu étudié.

Les études de biopsies de myomètres humains *in vitro* ont révélé que l'apeline inhibait les contractions utérines de l'ordre de 37% [117]. L'apeline et son récepteur APJ sont exprimés dans l'utérus de rongeurs mais aussi dans l'endomètre humain [117].

L'expression génique de l'apeline dans la glande mammaire augmente fortement pendant la gestation chez le rat, surtout au moment de la parturition. Les taux d'expression restent élevés au début de la lactation puis diminuent progressivement [177]. De manière intéressante, cette hormone est aussi présente dans le lait maternel chez l'Homme et les rongeurs [68;177;178]. Il est probable que l'apeline du lait puisse exercer des fonctions biologiques chez le nouveau-né via son action sur le tube digestif en période de lactation.

[2.4.2. Résultats](#)

[2.4.2.1. Introduction](#)

La prise en charge médicale des patientes obèses pendant leur grossesse est complexe en raison des nombreuses complications maternelles (risque de diabète, de prééclampsie, césariennes plus fréquentes) et fœtales (macrosomie, malformations, dystocie des épaules). De plus, les troubles de la croissance fœtale peuvent être à l'origine de nombreux troubles métaboliques à l'âge adulte et donc « transmettre » l'obésité de génération en génération.

L'apeline est un peptide exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme, il est sécrété par le tissu adipeux mais aussi par les organes de la mère pendant la gestation (placenta,

glande mammaire) et a même été retrouvée dans le lait maternel [177]. Le système apelinergique pourrait jouer un rôle dans la gestation mais très peu d'études se sont portées sur ses variations dans cette situation.

Les objectifs de cette dernière étude sont les suivants :

⌘ **Quelles sont les variations de l'apelinémie chez la souris obèse ?**

⌘ **Comment l'apelinémie évolue-t-elle au cours de la gestation chez la souris obèse ?**

2.4.2.2. Matériel et Méthodes

Quarante souris femelles et dix souris mâles C57Bl/6J (Janvier ®, Le Genest Saint Isle, France) ont été reçues à l'âge de 4 et 8 semaines respectivement, au Département Hospitalo-Universitaire en Recherche Expérimentale (DHURE) du Pôle Recherche de la Faculté de Médecine (Université Lille 2).

Dès 5 semaines de vie, 20 souris femelles (et les souris mâles) ont été nourries par un régime alimentaire standard (Safe® A04, Augy France) et constituaient le groupe Témoin. Les 20 souris restantes ont été soumises à un régime hypercalorique (45% de lipides, 35% de hydrates de carbone, Special Diet Services, Witham, Royaume-Uni) pour une durée de 3 mois. Ce groupe a été qualifié de groupe « HF » pour « *High Fat* ». Les conditions d'hébergement étaient les suivantes : $22 \pm 1^\circ\text{C}$ avec un éclairage artificiel 10h/24h. Toutes les expérimentations ont été réalisées en accord avec la directive européenne 2010/63/UE.

Au terme de l'exposition à ces régimes, un test de tolérance au glucose a été réalisé. Une charge de glucose (2 g/kg) était administrée par voie orale après 6 heures de jeûne et la glycémie était mesurée 30 minutes avant le gavage (T-30), au moment du gavage (T0) puis 15, 30, 45, 60, 90, et 120 minutes après la charge de glucose (T15, T30, T45, T60, T90, T120). L'insulinémie et l'apelinémie ont été mesurées à T-30 par ELISA (Référence 10-1247-01, Mercodia, Suède pour l'insuline et Référence EKE-057-23, Phoenix Pharmaceuticals, Strasbourg pour l'apeline). Le calcul de l'index d'insulinorésistance (HOMA-IR pour *Homeostasis Model of Assessment-Insulin Resistance*) a été calculé selon la formule suivante : $[(\text{Glycémie à jeun (mg/dL)} \times \text{Insulinémie à jeun } (\mu\text{U/mL})) / 405]$.

Nous avons procédé à des frottis vaginaux (lavage vaginal avec du sérum physiologique puis dépôt sur lame et coloration au crystal violet 0,1%) pour connaître la phase du cycle œstral des femelles avant de les placer avec des mâles pour une nuit. La présence d'un bouchon vaginal le lendemain matin certifiait le début d'une gestation et les femelles étaient alors considérées au terme E0,5 (pour 0,5 jours de gestation). Nous avons alors réalisé des dosages d'insuline et d'apeline plasmatiques à jeun, à E6,5, E12,5 et E18,5.

Le sacrifice des femelles gestantes a eu lieu à E18,5, par décapitation sous anesthésie à l'isoflurane. Nous avons procédé à une césarienne, nous avons pesé les fœtus et leurs placentas et prélevé un pool de sang par portée. Nous avons prélevé chez les mères l'hypothalamus, le cœur, les poumons, le tissu adipeux brun, les tissus adipeux blancs périrénaux et périgonadiques, les reins, les surrénales et les ovaires. Nous avons conservé les plasmas des mères à -20°C pour des dosages ultérieurs.

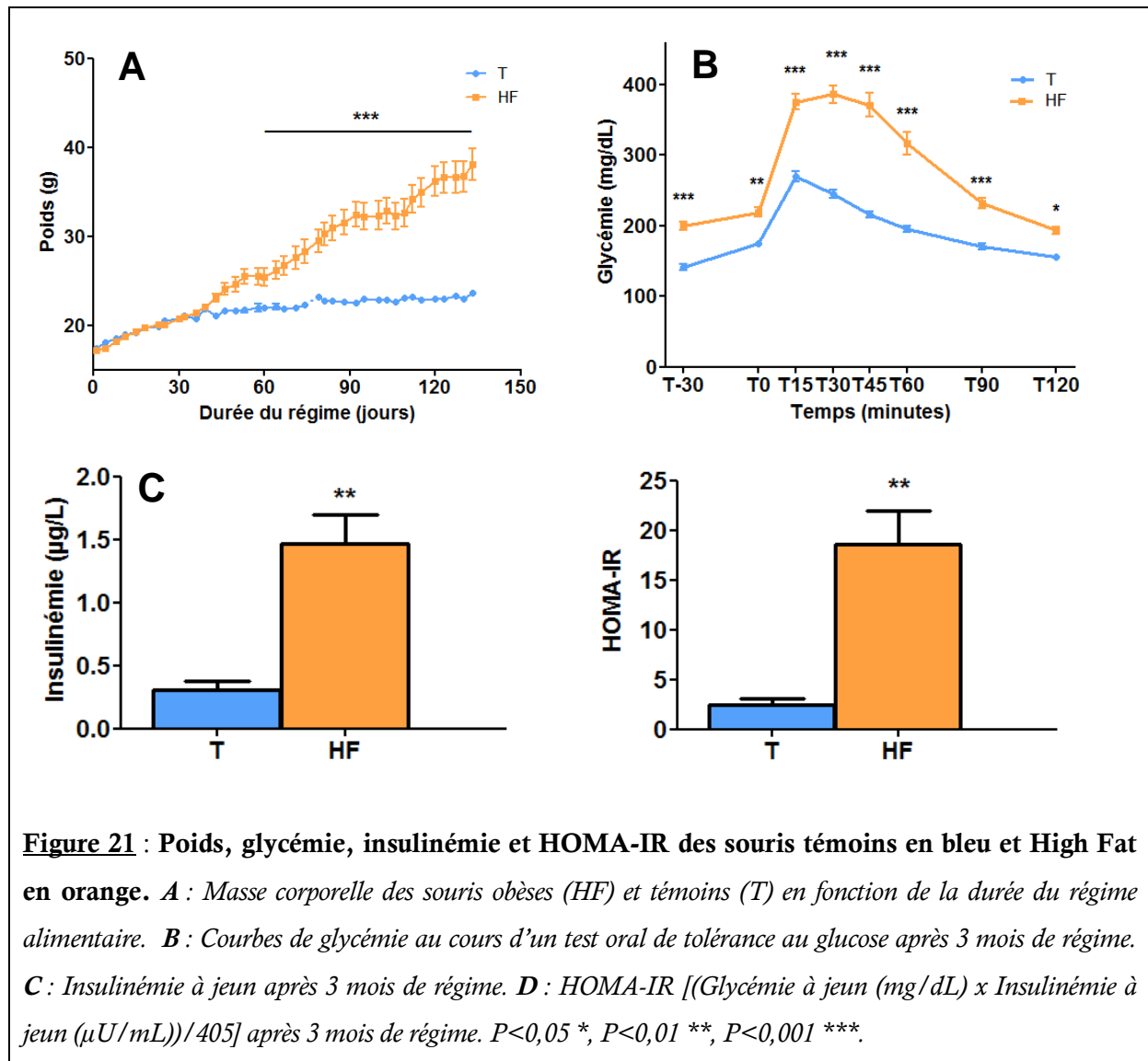
Les tests statistiques ont été réalisés sur GraphPad Prism® version 5.03. Les valeurs sont présentées par les moyennes \pm SEM. Le seuil de significativité a été fixé à $P < 0,05$. Des *t*-tests ou des One-way ANOVA ont été réalisés pour comparer les groupes deux à deux et des Two-way ANOVA ont été effectués pour les mesures répétées dans le temps suivi d'un test *post-hoc* de Bonferroni.

2.4.2.3. Résultats préliminaires

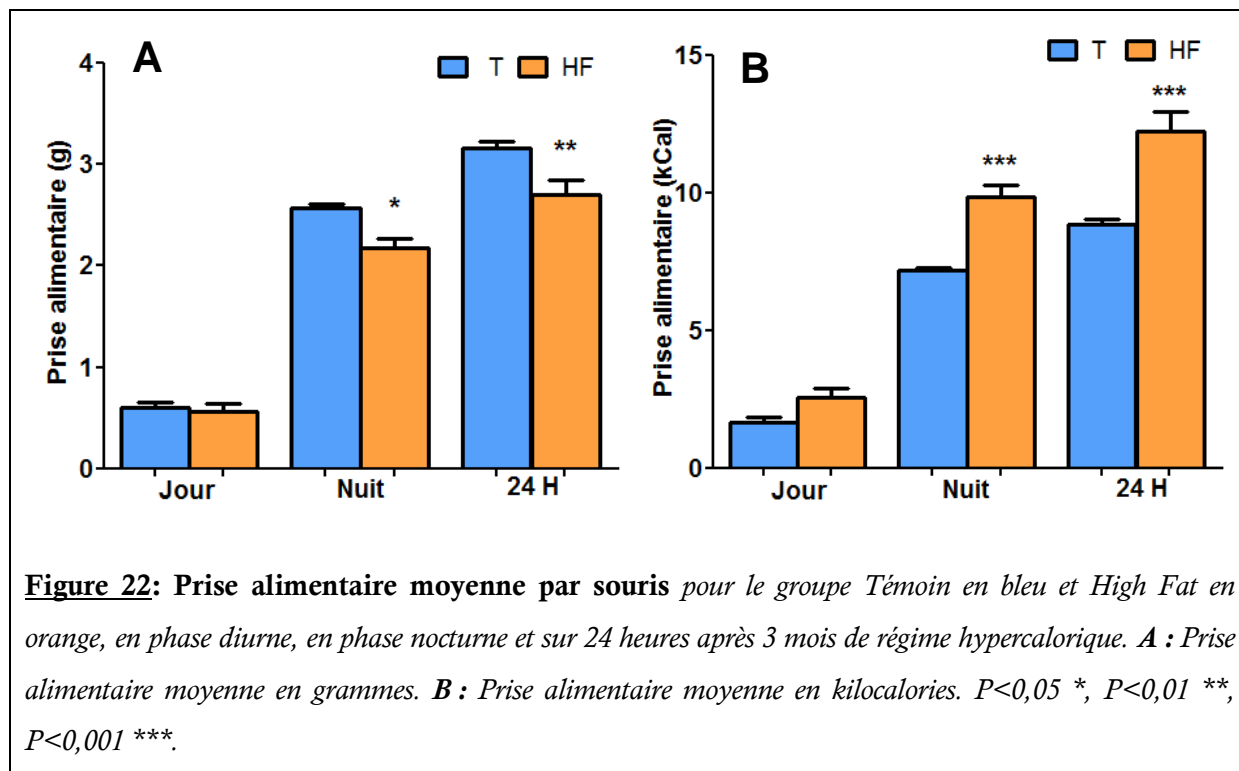
2.4.2.3.1. Souris obèses et intolérantes au glucose

L'exposition au régime hypercalorique contenant 45% de graisse et 35 % d'hydrates de carbone a entraîné un surpoids chez les souris HF dès le 56^{ème} jour de régime. Après 3 mois de régime hypercalorique les souris HF étaient obèses (Figure 21A, $23,67 \pm 0,25$ g versus $35,28 \pm 2,38$ g, $P < 0,001$). Les souris HF présentaient une hyperglycémie à jeun et une intolérance au glucose ; les glycémies des souris obèses restaient supérieures à celles des souris contrôles jusqu'à 120 minutes après la charge orale de glucose (Figure 21B). Les souris HF présentaient une hyperinsulinémie à jeun avec une insulinémie presque 5 fois augmentée par rapport à l'insulinémie des souris contrôles (Figure 21C, $0,30 \pm 0,07$ $\mu\text{g/L}$ versus $1,46 \pm 0,23$ $\mu\text{g/L}$). Les souris HF ont un HOMA-IR (marqueur de l'insulinorésistance) nettement supérieur au calcul de l'HOMA-IR moyen des souris

contrôles, ce qui confirme l'altération du métabolisme glucidique chez les souris obèses (Figure 21D).

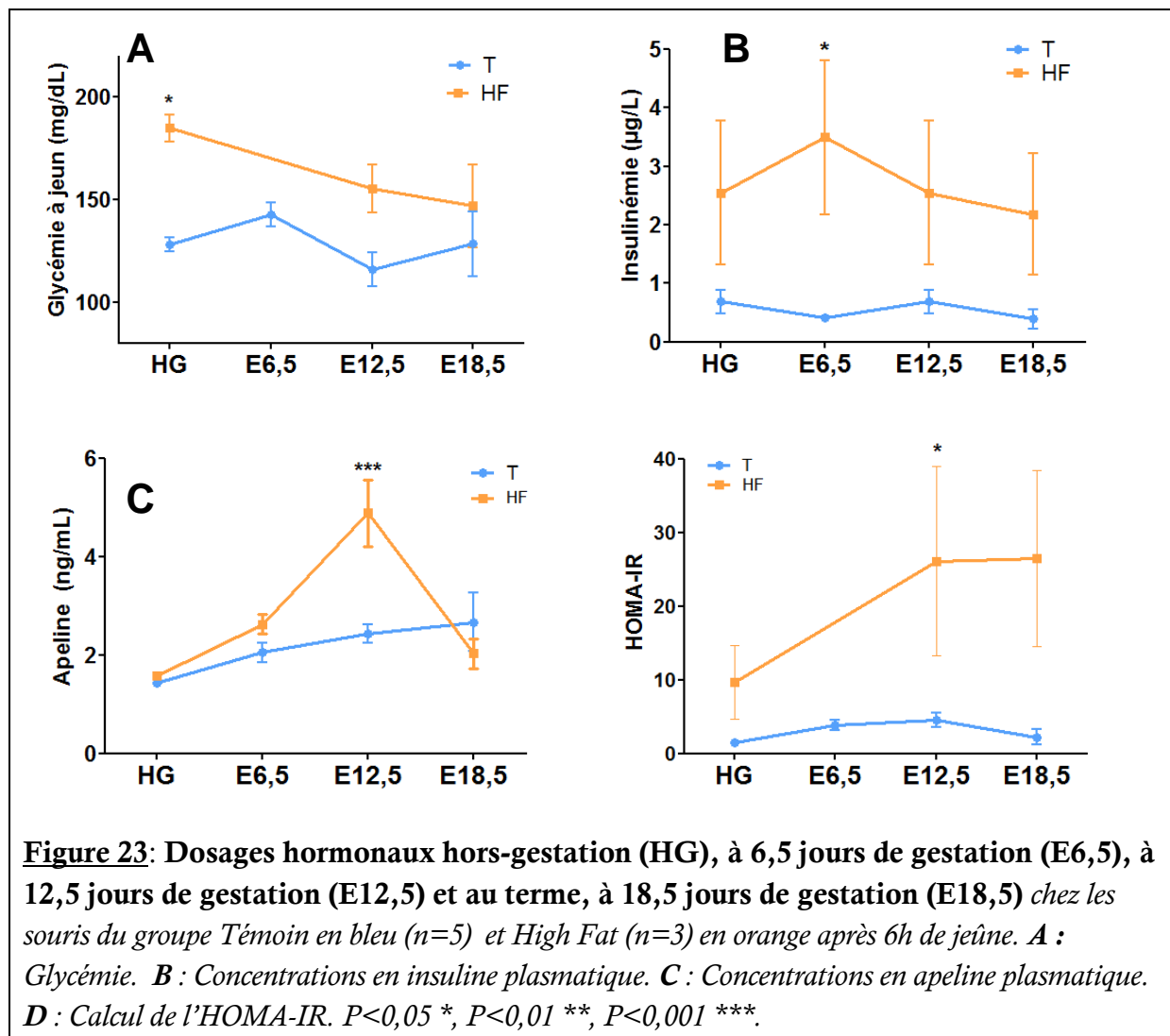


L'étude du comportement alimentaire a révélé une baisse de la prise alimentaire en phase nocturne et sur 24 heures chez les souris obèses (Figure 22A), mais la ration quotidienne en kilocalories montre que l'apport alimentaire des souris obèses était significativement supérieur à celui des souris témoins la nuit et sur 24 heures (Figure 22B, $P < 0,001$).



2.4.2.3.2. Paramètres morphologiques maternels

Les variations de la glycémie, de l'insulinémie et de l'apelinémie au cours de la gestation sont présentées dans la [Figure 23](#). La glycémie des animaux contrôles variait peu en comparaison à la valeur de la glycémie obtenue à jeun, en dehors de la gestation, alors que la glycémie moyenne des souris obèses diminue au cours de la gestation ([Figure 23A](#)). L'insulinémie des souris obèses était supérieure à celle des souris témoins que ce soit avant ou pendant la gestation avec une différence significative à 6,5 jours de gestation ([Figure 23B](#), à E6,5 $0,42 \pm 0,04 \mu\text{g/L}$ versus $3,50 \pm 1,32 \mu\text{g/L}$ pour le groupe T et HF respectivement, $P < 0,05$). L'apelinémie des souris obèses montrait un pic en milieu de gestation. A E12,5, les concentrations plasmatiques d'apeline étaient doublées chez les femelles obèses ($2,43 \pm 0,19 \text{ ng/mL}$ versus $4,89 \pm 0,68 \text{ ng/mL}$ pour les souris HF) ([Figure 23C](#)).



Les différents organes maternels prélevés au moment du sacrifice sont rapportés dans le Tableau 4. Ces données ont été obtenues en fin de gestation, à E18,5. Les souris HF avaient un poids supérieur à celui des souris témoins, avec une quantité de tissu adipeux blanc nettement augmentée (+ 400 % pour le tissu adipeux périrénal, $P<0,01$ et + 450% pour le tissu adipeux blanc périgonadique, $P<0,001$), les poids du tissu adipeux brun, du foie et des reins étaient aussi statistiquement augmentés chez les souris HF.

	T (n=8)	HF (n=5)
Poids corporel (g)	36,2 ± 0,9	48,9 ± 2,6 ^{***}
Tissu adipeux périrénal (mg)	167,7 ±55.5	828,4 ±183,0 ^{**}
Tissu adipeux périgonadique (mg)	127,6 ±17,3	705,0 ±135,4 ^{***}
Tissu adipeux brun (mg)	95,4.0 ±11,7	219,8 ± 62,6 [*]
Cœur (mg)	152,2 ±5,7	172,3 ±12,9
Poumons (mg)	155,5 ± 6,9	166,7 ± 8,5
Foie (mg)	1376.0 ± 28,1	1750.0 ± 105,5 ^{**}
Reins (mg)	318,7 ±10,9	401,9 ± 26,7 ^{**}
Surrénales (mg)	9,5 ± 0,8	9,9 ±0,7
Ovaires (mg)	14,8 ± 0,8	12,6 ±1,1

Tableau 4: Masse des organes maternels à E18,5. $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***.

2.4.2.3.3. Paramètres maternels et fœtaux

La taille de la portée des souris obèses avait tendance à être inférieure avec un nombre moyen de souriceaux par portée égal à 5 pour le groupe HF contre 6 pour le groupe T sans différence significative (Figure 24A). Les poids des souriceaux HF étaient réduits par rapport aux fœtus contrôles ($P < 0,001$, Figure 24B), et nous avons noté une augmentation du poids des placentas des souriceaux issus de mères obèses ($P < 0.01$, Figure 24C, Tableau 5).

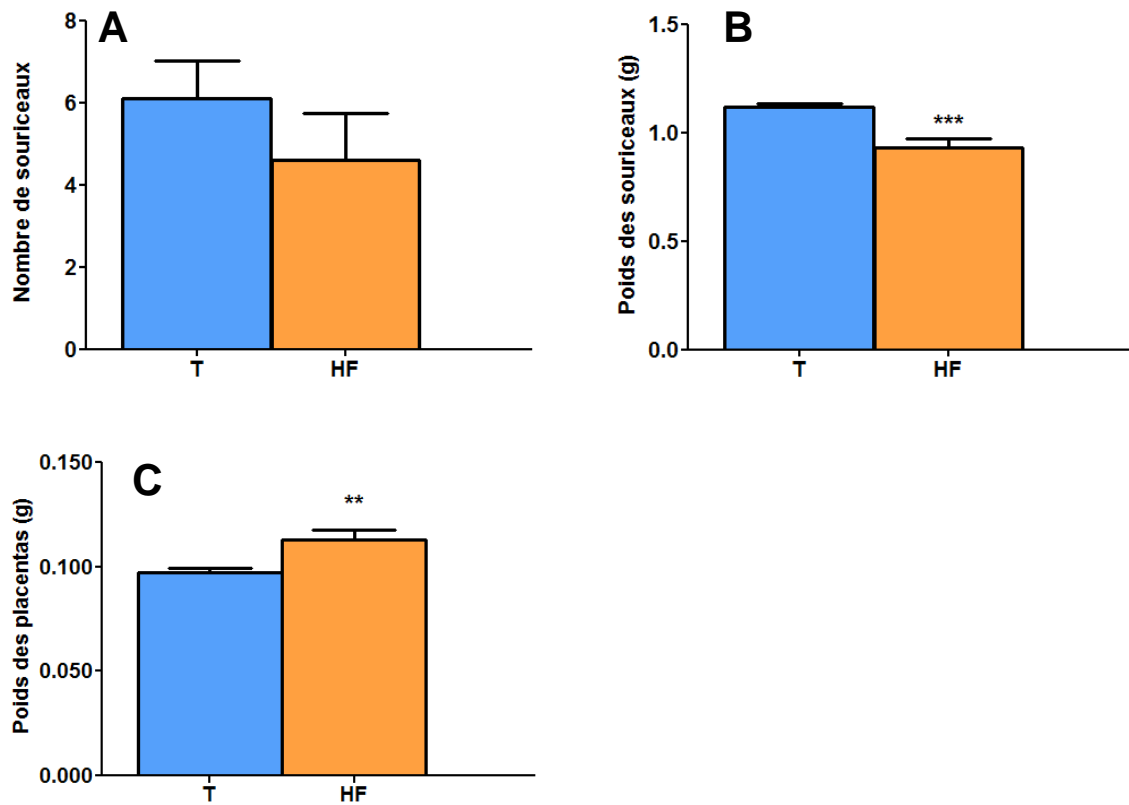


Figure 24 : Paramètres morphologiques des souriceaux. *A : Nombre de souriceaux par portée Témoin en bleu et High Fat en orange. B : Poids moyen des souriceaux à E18,5. C : Poids moyen des placentas à E18,5. $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***.*

Mères

	T (n=8)	HF (n=5)
Gain de poids pendant la gestation (g)	12,5 ± 0,9	8,5 ± 1,0 *
Glycémie à jeun (g/L)	1.34 ± 0.11	1.51 ± 0.11
Insulinémie à jeun (µg/L)	0.2 ± 0.2	2.8 ± 2.1
Apelinémie à jeun (ng/mL)	2.7 ± 1.3	2.0 ± 0.5
HOMA-IR	2.2 ± 1.0	26.6 ± 11.9

Souriceaux

	T (n=53)	HF (n=23)
Nombre de souriceaux par portée	6 ± 1	5 ± 1
Poids des souriceaux (mg)	1118,0 ± 16	931,3 ± 42,4***
Poids des placentas (mg)	99,8 ± 1,9	112,1 ± 3,8 **
Apelinémie (ng/mL)	10,9 ± 4,5	12,6 ± 9,6

Tableau 5: Paramètres biologiques et morphologiques maternels et fœtaux à E18,5. n= 8 mères témoins et n=5 mères High Fat sauf pour l'insulinémie, l'apelinémie, et l'HOMA-IR (n=5 T et n=3 HF), P<0,05 *, P<0,01 **, P<0,001***.

2.4.2.4. Discussion

Ces résultats montrent qu'en dehors de la gestation, les souris ayant reçu un régime hypercalorique pendant 3 mois étaient obèses, hyperphagiques et intolérantes au glucose. Elles étaient hyperinsulinémiques mais ne présentaient pas d'hyperapelinémie (résultats non présentés, 2,01 ± 0,21 ng/mL pour le groupe témoin versus 2,39 ± 0,27 ng/mL pour le groupe « High Fat »). Pendant la gestation, les souris HF présentaient un pic d'apelinémie à E12,5 associé à une élévation de l'HOMA-IR.

En recherche expérimentale, les souris C57Bl/6J sont les plus utilisées pour développer des troubles métaboliques [165;179] après l'exposition à un régime alimentaire hypercalorique (45% de lipides et 35 % de glucides). La susceptibilité de cette souche de souris à ce type de régime alimentaire est confirmée dans notre étude par un surpoids dès le 56^{ème} jour du régime, puis par une intolérance au glucose et une insulino-résistance

(déterminée par le calcul de l'HOMA-IR) après 3 mois de régime [180]. L'obésité était assez marquée puisque les dépôts adipeux prélevés lors des sacrifices étaient nettement augmentés chez les souris du groupe HF ($P < 0,01$ pour le tissu adipeux périrénal et $P < 0,001$ pour le tissu adipeux périgonadique).

Chez la souris obèse, la fertilité est réduite. Les altérations du développement embryonnaire chez les souriceaux de mères obèses sont présentes dès le stade zygote voire dès l'ovocyte avec principalement des anomalies mitochondriales [181;182]. La réduction de la croissance fœtale s'ajoute au nombre réduit d'implantations de blastocystes chez ces animaux [183]. Le RCIU observé chez les souriceaux de mères obèses après une alimentation hypercalorique a déjà été montré par plusieurs équipes [182;183], ainsi qu'une augmentation du poids du placenta [140]. Dans notre étude, le gain de poids pendant la gestation des souris obèses était inférieur à celui des souris contrôles ($P < 0,01$). Cette différence peut être due au nombre de souriceaux par portée qui est légèrement réduit chez les souris obèses.

Au sein de notre équipe, nous avons montré que l'apelinémie ne variait pas en fonction du cycle œstral chez les femelles, et nous avons confirmé les observations de Boucher *et al.* avec une apelinémie diminuée quand les souris étaient à jeun [84;184]. C'est la raison pour laquelle tous les prélèvements réalisés au cours de la gestation ont été effectués après un jeûne de 6 heures [180].

Plusieurs études ont montré une hausse d'apeline plasmatique en cas d'obésité [84;91;185;186] mais pas toutes [187]. L'apelinémie ne serait pas liée à l'obésité elle-même puisqu'il n'y a pas de réelle corrélation entre apeline et IMC, en revanche, des liens ont été établis entre les concentrations en apeline et en TNF- α , en triglycérides, en HbA1c (hémoglobine glyquée), en glucose [88]. L'étude de Boucher *et al.* suggérait que l'hyperapelinémie ne pouvait être retrouvée chez les personnes obèses qu'en présence d'un hyperinsulinisme [84]. Pourtant Soriguer *et al.* ont montré qu'une obésité morbide chez l'Homme (IMC supérieur à 50 dans cette étude) n'était pas associée à une hyperapelinémie si le métabolisme glucidique du sujet n'était pas altéré même s'il y avait hyperinsulinisme. En revanche, dès que des troubles de la tolérance glucidique étaient déclarés, l'apelinémie augmentait [187].

L'injection au niveau central d'une faible dose d'apeline (10 pM en i.c.v.) chez la souris augmente la tolérance glucidique et diminue la glycémie, alors qu'une haute dose (20 nM en i.c.v.) augmente la glycémie à jeun et l'insulinémie [77]. L'effet hyperglycémiant de l'apeline est retrouvé quand l'injection à haute dose est réalisée chez des souris obèses. Lorsque qu'un bolus d'apeline est injecté par voie intra-veineuse avant un test de tolérance au glucose, la tolérance glucidique est considérablement augmentée [77]. De plus, l'apelinémie est corrélée à l'insulinorésistance évaluée par l'HOMA-IR [88]. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que l'augmentation des concentrations d'apeline pourrait être un mécanisme de compensation pour retarder la mise en place de l'insulinorésistance chez les souris obèses.

La grossesse est considérée comme une période durant laquelle l'insulinosensibilité est diminuée [43]. Chez le rat, la prise de poids maternel s'accompagne d'une hypertrophie des adipocytes [188]. Etant donné que l'apeline est sécrétée par les adipocytes [84], elle pourrait donc être impliquée dans certains phénomènes métaboliques au cours de la grossesse. Dans notre étude, nous avons observé un pic d'apeline plasmatique chez les souris obèses à E12,5. Cette augmentation était associée à ce terme à une augmentation de l'insulinorésistance chez les souris obèses ($P < 0,01$).

Pour conclure, de nombreuses incertitudes persistent sur le rôle que l'apelinémie pourrait jouer en dehors et au cours de la gestation. Un probable lien entre l'apelinémie et l'insulinorésistance doit encore être démontré, et ces informations pourraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation entre l'apelinémie et la sensibilité à l'insuline au cours de la gestation.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

1. PERSPECTIVES

1.1. Le modèle L-NAME

1.1.1. Paramètres métaboliques : utilisation d'un régime hypercalorique ?

Le modèle animal avec inhibition de la NO synthase en fin de gestation (modèle L-NAME), nous a montré ses limites en termes de programmation métabolique à l'âge adulte. Il semblerait que le retard de croissance induit par l'insuffisance placentaire ne soit pas assez « puissant » pour provoquer chez la descendance exposée : un surpoids, des troubles glucidiques ou encore une altération du comportement alimentaire. Il pourrait être intéressant d'étudier la descendance L-NAME en approfondissant l'analyse du métabolisme glucidique (avec évaluation de la sensibilité à l'insuline à l'âge de 3 mois et mesure de l'expression des transporteurs du glucose GLUT4 dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux). Nous pourrions aussi envisager de suivre ces animaux à un âge plus avancé, car comme Hales et Ozanne l'ont montré certains diabètes apparaissent très tardivement (vers l'âge de 15 mois, [129]).

Les rats mâles avec RCIU après exposition au L-NAME ne présentaient pas de surpoids ou de diabète. Mais parfois c'est par l'exposition à un régime hypercalorique pendant plusieurs mois que les traits métaboliques les plus marqués pourraient apparaître. Ces conditions environnementales alimentaires refléteraient mieux la problématique nutritionnelle actuelle avec une alimentation riche en énergie et en lipides et particulièrement déséquilibrée. Nous pourrions nous interroger sur les **effets d'un régime alimentaire hypercalorique chez les animaux L-NAME afin de savoir si cette alimentation accentuerait les altérations métaboliques observées à l'âge de 9 mois.**

Dans ce cadre, nous pourrions évaluer les paramètres biologiques (courbes de croissance, tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline, pression artérielle) et en parallèle analyser la prise alimentaire et la dépense énergétique de ces animaux à l'état vigile à l'aide de cages métaboliques. Cependant, ces études ne sont pas envisagées à l'avenir au laboratoire.

1.2.2. Système apelinergique dans l'unité foeto-placentaire

Dans ce même modèle animal, nous avons choisi d'étudier le système apelinergique pendant la gestation et au moment de la parturition (Article 4 en annexe). La mesure de l'apelinémie chez la rate gestante hypertendue L-NAME à E17, E19 et E21 n'a pas montré de différence par rapport aux rates contrôles. L'étude de l'apelinémie pendant la gestation n'est pas très répandue ([64;176] chez la femme, [172] chez la rate), nous pourrions donc suivre l'apelinémie au cours des 3 semaines de gestation chez les rates témoins et L-NAME. Des études menées au sein de notre équipe de recherche (non publiées pour le moment) ont révélé que l'apelinémie au cours de la gestation variait pour atteindre un pic à E17 chez la rate contrôle [189], pic que nous n'avons pas retrouvé dans notre modèle. En revanche, chez le fœtus de rats à E21 le système apelinergique était modifié (sans différence significative pour les concentrations d'apeline plasmatique). Nous avons observé une augmentation de l'expression génique de l'apeline dans le cœur (x 2,5), et une augmentation de l'expression du récepteur APJ dans le poumon (x 11) et dans le placenta (x 9).

Nous pourrions donc nous demander si **l'augmentation de l'expression génique de l'apeline dans le cœur et les poumons des fœtus L-NAME modifiait la fonction de ces organes. Et si oui, par quel(s) mécanisme(s) ?** Le système cardio-respiratoire des fœtus L-NAME semble être affecté, en sachant que l'apeline est fortement exprimée dans ces organes [72;95], nous pourrions par la suite étudier le cœur et les poumons des animaux L-NAME. Des analyses histologiques pourraient nous permettre d'étudier l'aspect morphologique de ces deux organes et peut-être de mieux cerner le rôle de l'apeline chez le fœtus.

1.2. Le Fasudil (voie des Rho-kinases) : rôle dans la macrosomie ?

Nous avons initialement choisi le Fasudil pour ses propriétés vasodilatatrices indépendantes de la voie du NO. Comme nous l'attendions, la croissance des nouveau-nés de rates exposées à l'insuffisance placentaire induite par le L-NAME était améliorée ; mais le traitement par Fasudil programmat de façon franche le métabolisme de la descendance. Ces données sont en contradiction avec les données de la littérature qui montrent qu'un traitement par Fasudil améliore le métabolisme glucidique de rats adultes

diabétiques [156;190], ou encore diminue la quantité de tissu adipeux chez des souris obèses [157]. Nos résultats confirment un effet métabolique important du Fasudil quand il est administré durant la grossesse. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce composé soit plutôt délétère voire toxique en clinique s'il est administré durant la période périnatale.

Nous avons montré que le Fasudil améliorait la croissance des fœtus, et nous nous sommes interrogés sur le(s) mécanisme(s) à l'origine de ce phénomène. Nous avons développé précédemment le fait que la croissance des fœtus était majoritairement régulée par les *Insulin-like Growth Factors* 1 et 2. Nous pourrions mesurer leur concentration dans le plasma fœtal des ratons exposés au traitement maternel par Fasudil. Nous savons aussi que le transport des nutriments agit de manière directe sur la croissance fœtale, nous pourrions donc mesurer l'expression des principaux transporteurs présents sur la barrière hémato-placentaire par qRT-PCR (ex : GLUT 1 - transport du glucose de type 1- , SNATs - transporteurs des acides aminés - , FATPs - transporteurs des acides gras -...) pour comprendre si la macrosomie est due à un transfert accru vers le fœtus. L'expression génique des IGFs pourrait elle aussi être évaluée dans les placentas des fœtus Fasudil. Il faudrait alors déterminer quelles sont les molécules pouvant faire le lien entre la voie des Rho-kinases et les facteurs de croissance.

Enfin, nous pourrions mesurer l'activité des Rho-kinases placentaire chez des fœtus humains nés macrosomes afin de voir si l'inhibition de cette voie chez l'Homme pourrait en partie expliquer l'accélération de croissance. **Ces mesures permettraient de savoir si les Rho-kinases sont impliquées dans l'apparition de la macrosomie.** L'expression génique des Rho-kinases 1 et 2 pourrait aussi être mesurée dans le placenta pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

1.3. L'apeline : implication pendant la grossesse ?

L'apeline est une adipokine qui agit au niveau vasculaire et métabolique et qui pourrait être une cible de la croissance fœtale. Nous avons observé des modifications de l'expression de l'apeline et de son récepteur APJ dans le tissu adipeux brun, le foie, les reins et le tissu adipeux blanc périrénal chez la souris obèse. Une étude en cours au sein de notre équipe a montré que les concentrations en apeline plasmatique au cours de la

gestation étaient elles aussi modifiées, avec une concentration doublée chez les souris obèses à E12,5 par rapport aux souris contrôles.

Nous nous sommes demandé quel pouvait être le rôle de ce pic d'apelinémie chez la souris obèse gestante. Nous avons émis l'hypothèse que cette augmentation de l'apeline plasmatique pourrait être liée au développement de l'insulinorésistance observée chez ces souris en milieu et fin de gestation. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions mesurer l'expression de l'apeline dans les tissus adipeux maternels, dans les muscles squelettiques, le cœur et dans l'hypothalamus. Ainsi que l'expression des principaux acteurs du métabolisme glucidique (GLUT4, IRS-1...). Evaluer la quantité d'apeline et du récepteur APJ par qRT-PCR et Western-Blot à E12,5 et E18,5 pourrait aussi nous donner des informations sur la participation du système apelinergique au cours du développement fœtale chez la souris obèse.

Des études non publiées et menées au laboratoire chez le rat indiquent que le placenta est capable de sécréter de l'apeline et que cette hormone potentialise le transport placentaire du glucose de la mère au fœtus. Il serait donc très intéressant d'étudier si les placentas des animaux HF produisent plus d'apeline et d'étudier si celle-ci augmente le passage transplacentaire du glucose chez le fœtus de mère obèse ce qui pourrait expliquer la croissance accrue des nouveau-nés macrosomes de mères obèses, voire leur vulnérabilité augmentée au diabète à l'âge adulte.

Enfin, l'obésité est associée à un état basal d'inflammation [42]. Il pourrait être intéressant d'étudier le système inflammatoire à travers la présence de cytokines (TNF α , Interleukines...) chez la mère, et les fœtus dans le cadre d'une obésité au cours de la gestation.

Le principal intérêt de toutes ces expérimentations est la transposition des résultats à l'Homme. Le système apelinergique est depuis quelques années étudié chez l'Homme. Quelques études ont été menées chez la femme enceinte [64;176], chez des femmes obèses [91], chez des sujets diabétiques et obèses [187] mais aucun à notre connaissance chez la femme enceinte obèse. **Un protocole d'études cliniques est actuellement en projet dans notre laboratoire pour étudier les variations de l'apelinémie chez la femme obèse pendant la grossesse.**

2. CONCLUSION GÉNÉRALE

En conclusion, nous avons démontré que l'inhibition de la voie des Rho-kinases en fin de gestation programme chez la descendance un surpoids, une hyperglycémie et à une altération de la prise alimentaire chez le rat. Ayant démontré que le système adénergique est altéré chez des souris femelles obèses et intolérantes au glucose, et que ce système est modulé durant la grossesse, il nous reste à déterminer si ce système endocrinien pourrait être à l'origine d'altérations physiopathologiques durant la grossesse et chez la descendance en condition d'obésité maternelle.

ANNEXES

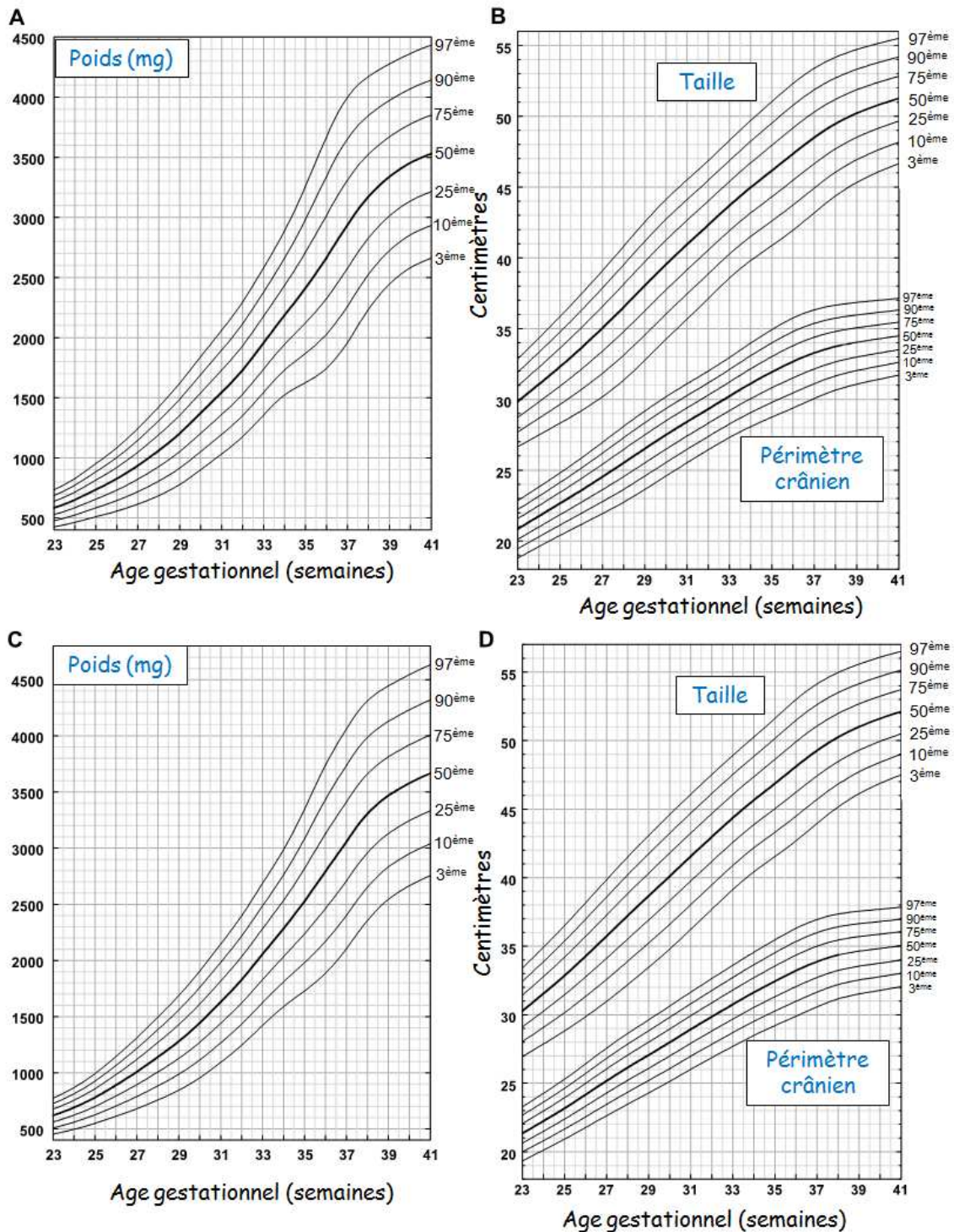


Figure 25: Courbes de croissance en fonction de l'âge gestationnel. Les enfants dont le poids ou la taille est inférieur au 10^{ème} percentile sont considérées SGA (Small for gestational age), et s'ils sont au dessus du 90^{ème} percentile ils sont considérées comme LGA (Large for gestational age). **A** : courbes de poids pour les filles. **B** : Courbes de taille pour les filles. **C** : Courbes de poids pour les garçons. **D** : Courbes de taille pour les garçons (Olsen et al. 2010).

Article n°4: “Maternal hypertension induces tissue-specific modulations of the apelinergic system in the fetoplacental unit in rat.” *Peptides*, 2012

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cha J, Sun X, Dey SK: Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* 2012;18:1754-1767.
2. Cakmak H, Taylor HS: Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment. *Hum Reprod Update* 2011;17:242-253.
3. Heffner LJ: *Reproduction humaine*. de Boeck, 2003.
4. O'Rahilly R: Human embryo. *Nature* 1987;329:385.
5. Elaine N Marieb: *Biologie Humaine, Principes d'anatomie et de physiologie*, ed 8ème édition. 2008.
6. Susan Storck. Health medline. 23-8-2012.
Ref Type: Internet Communication

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/patientinstructions/000603.htm>

7. Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, Johnson A, Osorio F, Goldberg C, Moore LG, Dahms T, Schrier RW: Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 1998;54:2056-2063.
8. Malassine A, Cronier L: Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine* 2002;19:3-11.
9. Enders AC, Carter AM: Review: The evolving placenta: different developmental paths to a hemochorial relationship
2. *Placenta* 2012;33 Suppl:S92-S98.
10. Frost JM, Moore GE: The importance of imprinting in the human placenta. *PLoS Genet* 2010;6:e1001015.
11. Goldman-Wohl D, Yagel S: Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol* 2002;187:233-238.
12. Kaufmann P, Black S, Huppertz B: Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1-7.
13. Rockwell LC, Vargas E, Moore LG: Human physiological adaptation to pregnancy: inter- and intraspecific perspectives. *Am J Hum Biol* 2003;15:330-341.
14. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F: Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:6.

15. Lager S, Powell TL: Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy* 2012;2012:179827.
16. Bell AW, Ehrhardt RA: Regulation of placental nutrient transport and implications for fetal growth. *Nutr Res Rev* 2002;15:211-230.
17. Militello M, Pappalardo EM, Ermito S, Dinatale A, Cavaliere A, Carrara S: Obstetric management of IUGR. *J Prenat Med* 2009;3:6-9.
18. Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA: Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol* 2010;5:173-192.
19. Srinivas SK, Edlow AG, Neff PM, Sammel MD, Andrela CM, Elovitz MA: Rethinking IUGR in preeclampsia: dependent or independent of maternal hypertension? *J Perinatol* 2009;29:680-684.
20. McCarthy AL, Woolfson RG, Raju SK, Poston L: Abnormal endothelial cell function of resistance arteries from women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1323-1330.
21. Yallampalli C, Dong YL, Wimalawansa SJ: Calcitonin gene-related peptide reverses the hypertension and significantly decreases the fetal mortality in pre-eclampsia rats induced by NG-nitro-Lmethyl ester. *Hum Reprod* 1996;11:895-899.
22. Friel AM, Sexton DJ, O'reilly MW, Smith TJ, Morrison JJ: Rho A/Rho kinase: human umbilical artery mRNA expression in normal and pre eclamptic pregnancies and functional role in isoprostane-induced vasoconstriction
1. *Reproduction* 2006;132:169-176.
23. Amberg GC, Navedo MF: Calcium dynamics in vascular smooth muscle
1. *Microcirculation* 2013;20:281-289.
24. Tawara S, Shimokawa H: Progress of the study of rho-kinase and future perspective of the inhibitor
3. *Yakugaku Zasshi* 2007;127:501-514.
25. Kafka P, Vajnerova O, Herget J, Hampf V: Rho-kinase inhibition attenuates acute hypoxic fetoplacental vasoconstriction in the rat
1. *Physiol Res* 2012;61 Suppl 2:S43-S48.
26. Olson MF: Applications for ROCK kinase inhibition
1. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:242-248.
27. Satoh S, Hitomi A, Ikegaki I, Kawasaki K, Nakazono O, Iwasaki M, Mohri M, Asano T: Amelioration of endothelial damage/dysfunction is a possible mechanism for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors against ischemic brain damage
3. *Brain Res Bull* 2010;81:191-195.

28. Fujita H, Fukumoto Y, Saji K, Sugimura K, Demachi J, Nawata J, Shimokawa H: Acute vasodilator effects of inhaled fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with pulmonary arterial hypertension
1. Heart Vessels 2010;25:144-149.
29. World Health Organization and Organisation mondiale de la santé. Global Health Observatory Overweight and Obesity. 2008.
Ref Type: Internet Communication

http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/

30. Ciangura C and Poitou-Bernert. Complications des obésités. Endocrinologie-Nutrition . 2011.
Ref Type: Magazine Article

<http://www.em-consulte.com/article/264659>

31. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, Lango AH, Lindgren CM, Luan J, Magi R, Randall JC, Vedantam S, Winkler TW, Qi L, Workalemahu T, Heid IM, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Weedon MN, Wheeler E, Wood AR, Ferreira T, Weyant RJ, Segre AV, Estrada K, Liang L, Nemesh J, Park JH, Gustafsson S, Kilpelainen TO, Yang J, Bouatia-Naji N, Esko T, Feitosa MF, Kutalik Z, Mangino M, Raychaudhuri S, Scherag A, Smith AV, Welch R, Zhao JH, Aben KK, Absher DM, Amin N, Dixon AL, Fisher E, Glazer NL, Goddard ME, Heard-Costa NL, Hoesel V, Hottenga JJ, Johansson A, Johnson T, Ketkar S, Lamina C, Li S, Moffatt MF, Myers RH, Narisu N, Perry JR, Peters MJ, Preuss M, Ripatti S, Rivadeneira F, Sandholt C, Scott LJ, Timpson NJ, Tyrer JP, van WS, Watanabe RM, White CC, Wiklund F, Barlassina C, Chasman DI, Cooper MN, Jansson JO, Lawrence RW, Pellikka N, Prokopenko I, Shi J, Thiering E, Alavere H, Alibrandi MT, Almgren P, Arnold AM, Aspelund T, Atwood LD, Balkau B, Balmforth AJ, Bennett AJ, Ben-Shlomo Y, Bergman RN, Bergmann S, Biebermann H, Blakemore AI, Boes T, Bonnycastle LL, Bornstein SR, Brown MJ, Buchanan TA, Busonero F, Campbell H, Cappuccio FP, Cavalcanti-Proenca C, Chen YD, Chen CM, Chines PS, Clarke R, Coin L, Connell J, Day IN, den HM, Duan J, Ebrahim S, Elliott P, Elosua R, Eiriksdottir G, Erdos MR, Eriksson JG, Facheris MF, Felix SB, Fischer-Posovszky P, Folsom AR, Friedrich N, Freimer NB, Fu M, Gaget S, Gejman PV, Geus EJ, Gieger C, Gjesing AP, Goel A, Goyette P, Grallert H, Grassler J, Greenawalt DM, Groves CJ, Gudnason V, Guiducci C, Hartikainen AL, Hassanali N, Hall AS, Havulinna AS, Hayward C, Heath AC, Hengstenberg C, Hicks AA, Hinney A, Hofman A, Homuth G, Hui J, Igl W, Iribarren C, Isomaa B, Jacobs KB, Jarick I, Jewell E, John U, Jorgensen T, Jousilahti P, Jula A, Kaakinen M, Kajantie E, Kaplan LM, Kathiresan S, Kettunen J, Kinnunen L, Knowles JW, Kolcic I, Konig IR, Koskinen S, Kovacs P, Kuusisto J, Kraft P, Kvaloy K, Laitinen J, Lantieri O, Lanzani C, Launer LJ, Lecoeur C, Lehtimäki T, Lettre G, Liu J, Lokki ML, Lorentzon M, Luben RN, Ludwig B, Manunta P, Marek D, Marre M, Martin NG, McArdle WL, McCarthy A, McKnight B, Meitinger T, Melander O, Meyre D, Midthjell K, Montgomery GW, Morcken MA, Morris AP, Mulic R, Ngwa JS, Nelis M, Neville MJ, Nyholt DR, O'Donnell CJ, O'Rahilly S, Ong KK, Oostra B, Pare G, Parker AN, Perola M, Pichler I,

- Pietilainen KH, Platou CG, Polasek O, Pouta A, Rafelt S, Raitakari O, Rayner NW, Ridderstrale M, Rief W, Ruukonen A, Robertson NR, Rzehak P, Salomaa V, Sanders AR, Sandhu MS, Sanna S, Saramies J, Savolainen MJ, Scherag S, Schipf S, Schreiber S, Schunkert H, Silander K, Sinisalo J, Siscovick DS, Smit JH, Soranzo N, Sovio U, Stephens J, Surakka I, Swift AJ, Tammesoo ML, Tardif JC, Teder-Laving M, Teslovich TM, Thompson JR, Thomson B, Tonjes A, Tuomi T, van Meurs JB, van Ommen GJ: Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 2010;42:937-948.
32. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI: A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;316:889-894.
 33. INSERM, KANTAR HEALTH, and ROCHE. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité ObEpi-Roche. 2012. Ref Type: Report
 34. Poston L: Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of offspring long term health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:627-639.
 35. Buschur E, Kim C: Guidelines and interventions for obesity during pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2012;119:6-10.
 36. Olson CM, Strawderman MS, Hinton PS, Pearson TA: Gestational weight gain and postpartum behaviors associated with weight change from early pregnancy to 1 y postpartum. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:117-127.
 37. Phelan S: Pregnancy: a "teachable moment" for weight control and obesity prevention. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:135-138.
 38. Siega-Riz AM, Viswanathan M, Moos MK, Deierlein A, Mumford S, Knaack J, Thieda P, Lux LJ, Lohr KN: A systematic review of outcomes of maternal weight gain according to the Institute of Medicine recommendations: birthweight, fetal growth, and postpartum weight retention. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:339-14.
 39. Linne Y, Dye L, Barkeling B, Rossner S: Long-term weight development in women: a 15-year follow-up of the effects of pregnancy. *Obes Res* 2004;12:1166-1178.
 40. Davis EM, Zyzanski SJ, Olson CM, Stange KC, Horwitz RI: Racial, ethnic, and socioeconomic differences in the incidence of obesity related to childbirth. *Am J Public Health* 2009;99:294-299.
 41. Deruelle P: [Obesity and pregnancy]. *Gynecol Obstet Fertil* 2011;39:100-105.

42. Frias AE, Grove KL: Obesity: a transgenerational problem linked to nutrition during pregnancy. *Semin Reprod Med* 2012;30:472-478.
43. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE: Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes
1. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S112-S119.
44. Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de MS: Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero
12. *Diabetes Care* 2009;32:1076-1080.
45. Langer O: Fetal macrosomia: etiologic factors. *Clin Obstet Gynecol* 2000;43:283-297.
46. Olsen IE, Groveman SA, Lawson ML, Clark RH, Zemel BS: New intrauterine growth curves based on United States data. *Pediatrics* 2010;125:e214-e224.
47. Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, Cameron IT, Ball SG, Wilson DI, Hanley NA: Beta cell differentiation during early human pancreas development
1. *J Endocrinol* 2004;181:11-23.
48. Gicquel C, Le BY: Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 2006;65 Suppl 3:28-33.
49. Smerieri A, Petraroli M, Ziveri MA, Volta C, Bernasconi S, Street ME: Effects of cord serum insulin, IGF-II, IGFBP-2, IL-6 and cortisol concentrations on human birth weight and length: pilot study. *PLoS One* 2011;6:e29562.
50. Yu Z, Han S, Zhu J, Sun X, Ji C, Guo X: Pre-pregnancy body mass index in relation to infant birth weight and offspring overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e61627.
51. Dashe JS, McIntire DD, Lucas MJ, Leveno KJ: Effects of symmetric and asymmetric fetal growth on pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol* 2000;96:321-327.
52. Lipkind HS, Curry AE, Huynh M, Thorpe LE, Matte T: Birth outcomes among offspring of women exposed to the September 11, 2001, terrorist attacks
1. *Obstet Gynecol* 2010;116:917-925.
53. Mairesse J, Lesage J, Breton C, Breant B, Hahn T, Darnaudery M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O: Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats
64. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E1526-E1533.
54. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE: The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 1998;4:25-42.

55. Thaete LG, Kushner DM, Dewey ER, Neerhof MG: Endothelin and the regulation of uteroplacental perfusion in nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction. *Placenta* 2005;26:242-250.
56. Ghalayini IF: Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility
2. *Int J Impot Res* 2004;16:459-469.
57. Winer N, Branger B, Azria E, Tsatsaris V, Philippe HJ, Roze JC, Descamps P, Boog G, Cynober L, Darmaun D: L-Arginine treatment for severe vascular fetal intrauterine growth restriction: a randomized double-blind controlled trial. *Clin Nutr* 2009;28:243-248.
58. Walsh JM, McAuliffe FM: Prediction and prevention of the macrosomic fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;162:125-130.
59. Ornoy A: Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reprod Toxicol* 2011;32:205-212.
60. Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, Huxley R, Cook DG, Anazawa S, Barrett-Connor E, Bhargava SK, Birgisdottir BE, Carlsson S, de R, Sr., Dyck RF, Eriksson JG, Falkner B, Fall C, Forsen T, Grill V, Gudnason V, Hulman S, Hypponen E, Jeffreys M, Lawlor DA, Leon DA, Minami J, Mishra G, Osmond C, Power C, Rich-Edwards JW, Roseboom TJ, Sachdev HS, Syddall H, Thorsdottir I, Vanhala M, Wadsworth M, Yarbrough DE: Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *JAMA* 2008;300:2886-2897.
61. Gamborg M, Byberg L, Rasmussen F, Andersen PK, Baker JL, Bengtsson C, Canoy D, Droyvold W, Eriksson JG, Forsen T, Gunnarsdottir I, Jarvelin MR, Koupil I, Lapidus L, Nilsen TI, Olsen SF, Schack-Nielsen L, Thorsdottir I, Tuomainen TP, Sorensen TI: Birth weight and systolic blood pressure in adolescence and adulthood: meta-regression analysis of sex- and age-specific results from 20 Nordic studies. *Am J Epidemiol* 2007;166:634-645.
62. Monti V, Carlson JJ, Hunt SC, Adams TD: Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults
2. *J Am Diet Assoc* 2006;106:822-828.
63. Christou H, Connors JM, Ziotopoulou M, Hatzidakis V, Papathanassoglou E, Ringer SA, Mantzoros CS: Cord blood leptin and insulin-like growth factor levels are independent predictors of fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:935-938.
64. Kourtis A, Gkiomisi A, Mouzaki M, Makedou K, Anastasilakis AD, Toulis KA, Gerou S, Gavana E, Agorastos T: Apelin levels in normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;75:367-371.

65. Pitkin SL, Maguire JJ, Bonner TI, Davenport AP: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev* 2010;62:331-342.
66. Llorens-Cortes C, Beaudet A: [Apelin, a neuropeptide that counteracts vasopressin secretion]. *Med Sci (Paris)* 2005;21:741-746.
67. Kleinz MJ, Davenport AP: Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 2005;107:198-211.
68. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M: Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:471-476.
69. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P: Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002;277:14838-14843.
70. El Messari S., Iturrioz X, Fassot C, De MN, Roesch D, Llorens-Cortes C: Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J Neurochem* 2004;90:1290-1301.
71. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T: A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993;136:355-360.
72. Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, Lawrie KW, Hervieu G, Riley G, Bolaky JE, Herrity NC, Murdock P, Darker JG: Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 2003;84:1162-1172.
73. Masri B, Knibiehler B, Audigier Y: Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology
1. *Cell Signal* 2005;17:415-426.
74. Zhou N, Zhang X, Fan X, Argyris E, Fang J, Acheampong E, DuBois GC, Pomerantz RJ: The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology* 2003;317:84-94.
75. Lee DK, Ferguson SS, George SR, O'Dowd BF: The fate of the internalized apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with beta-arrestin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;395:185-189.
76. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M: Molecular and

- functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000;275:21061-21067.
77. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenne C, Burcelin R, Castan-Laurell I, Valet P: Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008;8:437-445.
 78. Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, Kundu RK, Reaven GM, Quertermous T, Tsao PS: Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E59-E67.
 79. Zhong JC, Yu XY, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Lin SG: Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 2007;74:388-395.
 80. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, Sugaya T, Matsuzaki H, Yamamoto R, Shiota N, Okunishi H, Kihara M, Umemura S, Sugiyama F, Yagami K, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukamizu A: Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:26274-26279.
 81. Xu S, Han P, Huang M, Wu JC, Chang C, Tsao PS, Yue P: In vivo, ex vivo, and in vitro studies on apelin's effect on myocardial glucose uptake
3. *Peptides* 2012;37:320-326.
 82. Dray C, Foussal C, Attané C, Kunduzova O, Daviaud D, Valet P, and Castan-Laurell I. L'apeline: de la fonction cardiaque au métabolisme énergétique. *Sang Thrombose Vaisseaux* 21 n°7. 2009.
Ref Type: Magazine Article
 83. Hardie DG: The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 2004;117:5479-5487.
 84. Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpenne C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P: Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005;146:1764-1771.
 85. Ringstrom C, Nitert MD, Bennet H, Fex M, Valet P, Rehfeld JF, Friis-Hansen L, Wierup N: Apelin is a novel islet peptide. *Regul Pept* 2010;162:44-51.
 86. Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, Valet P: Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:234-241.
 87. Sorhede WM, Magnusson C, Ahren B: The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept* 2005;131:12-17.
 88. Castan-Laurell I, Dray C, Attane C, Duparc T, Knauf C, Valet P: Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 2011;40:1-9.

89. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, Ayav A, Ziegler O, Carpenne C, Saulnier-Blache JS, Valet P, Castan-Laurell I: TNF α up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J* 2006;20:1528-1530.
90. Andersen CU, Hilberg O, Mellemkjaer S, Nielsen-Kudsk JE, Simonsen U: Apelin and pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 2011;1:334-346.
91. Castan-Laurell I, Vitkova M, Daviaud D, Dray C, Kovacicova M, Kovacova Z, Hejnova J, Stich V, Valet P: Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur J Endocrinol* 2008;158:905-910.
92. Jia JJ, Tian YB, Cao ZH, Tao LL, Zhang X, Gao SZ, Ge CR, Lin QY, Jois M: The polymorphisms of UCP1 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Mol Biol Rep* 2010;37:1513-1522.
93. Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H: Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 2007;148:2690-2697.
94. Reaux A, De MN, Skultetyova I, Lenkei Z, El MS, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortes C: Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 2001;77:1085-1096.
95. Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM: Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides* 2012;33:139-148.
96. Stockand JD: Vasopressin regulation of renal sodium excretion. *Kidney Int* 2010;78:849-856.
97. Valle A, Hoggard N, Adams AC, Roca P, Speakman JR: 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* 2008;20:79-84.
98. Sunter D, Hewson AK, Dickson SL: Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 2003;353:1-4.
99. O'Shea M, Hansen MJ, Tatemoto K, Morris MJ: Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci* 2003;6:163-167.
100. Reaux-Le Goazigo, Bodineau L, De MN, Jeandel L, Chartrel N, Knauf C, Raad C, Valet P, Llorens-Cortes C: Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301:E955-E966.

101. Devic E, Paquereau L, Vernier P, Knibiehler B, Audigier Y: Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* 1996;59:129-140.
102. Japp AG, Newby DE: The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 2008;75:1882-1892.
103. Japp AG, Cruden NL, Amer DA, Li VK, Goudie EB, Johnston NR, Sharma S, Neilson I, Webb DJ, Megson IL, Flapan AD, Newby DE: Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:908-913.
104. Zhong JC, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Leung FP, Wong WT, Lin SG, Yu XY: The novel peptide apelin regulates intrarenal artery tone in diabetic mice. *Regul Pept* 2007;144:109-114.
105. Siddiquee K, Hampton J, McAnally D, May L, Smith L: The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br J Pharmacol* 2013;168:1104-1117.
106. Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF: Apelin: a novel neurohumoral modulator of the cardiovascular system. Pathophysiologic importance and potential use as a therapeutic target
5. *Rev Port Cardiol* 2005;24:1263-1276.
107. Szokodi I, Tavi P, Foldes G, Voutilainen-Myllyla S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuhola J, Rysa J, Toth M, Ruskoaho H: Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002;91:434-440.
108. Zhang J, Ren CX, Qi YF, Lou LX, Chen L, Zhang LK, Wang X, Tang C: Exercise training promotes expression of apelin and APJ of cardiovascular tissues in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2006;79:1153-1159.
109. Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA: Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006;8:355-360.
110. Ladeiras-Lopes R, Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF: The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications
2. *Arq Bras Cardiol* 2008;90:343-349.
111. Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, Hinuma S, Baba A: Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:395-400.
112. Cleaver O, Tonissen KF, Saha MS, Krieg PA: Neovascularization of the *Xenopus* embryo
2. *Dev Dyn* 1997;210:66-77.

113. Malamitsi-Puchner A, Gourgiotis D, Boutsikou M, Baka S, Hassiakos D, Briana DD: Circulating apelin concentrations in mother/infant pairs at term
4. *Acta Paediatr* 2007;96:1751-1754.
114. Devic E, Rizzoti K, Bodin S, Knibiehler B, Audigier Y: Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mech Dev* 1999;84:199-203.
115. Moynihan AT, Hehir MP, Glavey SV, Smith TJ, Morrison JJ: Inhibitory effect of leptin on human uterine contractility in vitro
15. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:504-509.
116. Hehir MP, Glavey SV, Morrison JJ: Uterorelaxant effect of ghrelin on human myometrial contractility
10. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:323-325.
117. Hehir MP, Morrison JJ: The adipokine apelin and human uterine contractility
19. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:359-5.
118. Dray C, Sakar Y, Vinel C, Daviaud D, Masri B, Garrigues L, Wanecq E, Galvani S, Negre-Salvayre A, Barak LS, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Valet P, Castan-Laurell I, Ducroc R: The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice
12. *Gastroenterology* 2013;144:771-780.
119. Vickers MH: Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention. *World J Diabetes* 2011;2:137-148.
120. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME: Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989;298:564-567.
121. Hales CN, Barker DJ: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
122. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993;36:62-67.
123. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation
5. *Diabet Med* 2006;23:469-480.
124. Gatford KL, Simmons RA, De Blasio MJ, Robinson JS, Owens JA: Review: Placental programming of postnatal diabetes and impaired insulin action after IUGR
3. *Placenta* 2010;31 Suppl:S60-S65.
125. Hales CN, Barker DJ: The thrifty phenotype hypothesis
1. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.

126. Barker DJ: Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 2004;58:114-115.
127. Cianfarani S, Germani D, Branca F: Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis
2. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:F71-F73.
128. Dulloo AG: Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance
3. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:155-171.
129. Hales CN, Ozanne SE: The dangerous road of catch-up growth
1. *J Physiol* 2003;547:5-10.
130. Vaag A: Low birth weight and early weight gain in the metabolic syndrome: consequences for infant nutrition
38. *Int J Gynaecol Obstet* 2009;104 Suppl 1:S32-S34.
131. Deierlein AL, Siega-Riz AM, Chantala K, Herring AH: The association between maternal glucose concentration and child BMI at age 3 years
2. *Diabetes Care* 2011;34:480-484.
132. Grayson BE, Levasseur PR, Williams SM, Smith MS, Marks DL, Grove KL: Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet
57. *Endocrinology* 2010;151:1622-1632.
133. Sullivan EL, Grayson B, Takahashi D, Robertson N, Maier A, Bethea CL, Smith MS, Coleman K, Grove KL: Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring
29. *J Neurosci* 2010;30:3826-3830.
134. Bouret SG, Simerly RB: Developmental programming of hypothalamic feeding circuits
1. *Clin Genet* 2006;70:295-301.
135. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL: Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease
22. *N Engl J Med* 2008;359:61-73.
136. Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP: Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension
31. *Development* 2000;127:4195-4202.
137. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ: Epigenetic programming by maternal behavior
1. *Nat Neurosci* 2004;7:847-854.

138. Harder T, Bergmann R, Kallischnigg G, Plagemann A: Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis
2. *Am J Epidemiol* 2005;162:397-403.
139. Guerrero-Bosagna CM, Skinner MK: Epigenetic transgenerational effects of endocrine disruptors on male reproduction
1. *Semin Reprod Med* 2009;27:403-408.
140. Gallou-Kabani C, Gabory A, Tost J, Karimi M, Mayeur S, Lesage J, Boudadi E, Gross MS, Taurelle J, Vige A, Breton C, Reusens B, Remacle C, Vieau D, Ekstrom TJ, Jais JP, Junien C: Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet
2. *PLoS One* 2010;5:e14398.
141. Gicquel C, El-Osta A, Le BY: Epigenetic regulation and fetal programming
24. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:1-16.
142. Altun ZS, Uysal S, Guner G, Yilmaz O, Posaci C: Effects of oral L-arginine supplementation on blood pressure and asymmetric dimethylarginine in stress-induced preeclamptic rats
1. *Cell Biochem Funct* 2008;26:648-653.
143. Helmbrecht GD, Farhat MY, Lochbaum L, Brown HE, Yadgarova KT, Eglinton GS, Ramwell PW: L-arginine reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide synthase inhibition in the rat
1. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:800-805.
144. Yallampalli C, Garfield RE: Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia
2. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1316-1320.
145. Molnar M, Suto T, Toth T, Hertelendy F: Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation
1. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1458-1466.
146. Buhimschi CS, Gokdeniz R, Saade GR, Buhimschi IA, Garfield RE: The effect of chronic nitric oxide synthase inhibition on blood pressure and heart rate in unrestrained pregnant rats as recorded by radiotelemetry
2. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:159-164.
147. Fernandez CL, Carbajo RM, Munoz RM: Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats: effects on blood pressure, fetal growth and litter size
1. *Arch Gynecol Obstet* 2005;271:243-248.
148. Lubarsky SL, Ahokas RA, Friedman SA, Sibai BM: The effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on blood pressure and angiotensin II responsiveness in the pregnant rat
4. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:1069-1076.

149. Osol G, Barron C, Gokina N, Mandala M: Inhibition of nitric oxide synthases abrogates pregnancy-induced uterine vascular expansive remodeling
3. *J Vasc Res* 2009;46:478-486.
150. Edwards DL, Arora CP, Bui DT, Castro LC: Long-term nitric oxide blockade in the pregnant rat: effects on blood pressure and plasma levels of endothelin-1
4. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:484-488.
151. Olson GL, Saade GR, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield RE: The effect of an endothelin antagonist on blood pressure in a rat model of preeclampsia
1. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:638-641.
152. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I: Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator
19. *Nature* 1985;313:54-56.
153. Witlin AG, Gangula PR, Thompson ML, Yallampalli C: Growth and fertility rates in the offspring of pregnant rats treated with L-omega nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide inhibitor
3. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:89-93.
154. Sutton GM, Centanni AV, Butler AA: Protein malnutrition during pregnancy in C57BL/6J mice results in offspring with altered circadian physiology before obesity
24. *Endocrinology* 2010;151:1570-1580.
155. Khalil RA, Granger JP: Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models
2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R29-R45.
156. Kanda T, Wakino S, Homma K, Yoshioka K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, Sugano N, Hayashi K, Saruta T: Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension
5. *FASEB J* 2006;20:169-171.
157. Hara Y, Wakino S, Tanabe Y, Saito M, Tokuyama H, Washida N, Tatematsu S, Yoshioka K, Homma K, Hasegawa K, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Hayashi K, Nakayama K, Itoh H: Rho and Rho-kinase activity in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch
6. *Sci Signal* 2011;4:ra3.
158. Huang XN, Fu J, Wang WZ: The effects of fasudil on the permeability of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier following experimental autoimmune encephalomyelitis
2. *J Neuroimmunol* 2011;239:61-67.
159. Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D: Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin

- neurons in neonatal male rat pups
3. *Endocrinology* 2008;149:470-475.
160. Blondeau B, Lesage J, Czernichow P, Dupouy JP, Breant B: Glucocorticoids impair fetal beta-cell development in rats
1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E592-E599.
161. Seckl JR: Prenatal glucocorticoids and long-term programming
1. *Eur J Endocrinol* 2004;151 Suppl 3:U49-U62.
162. Jarvie E, Hauguel-de-Mouzon S, Nelson SM, Sattar N, Catalano PM, Freeman DJ: Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring
1. *Clin Sci (Lond)* 2010;119:123-129.
163. Arora S, Anubhuti: Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review
1. *Neuropeptides* 2006;40:375-401.
164. Kanasaki K, Koya D: Biology of obesity: lessons from animal models of obesity
14. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:197636.
165. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN: Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice
2. *Diabetes* 1988;37:1163-1167.
166. Winzell MS, Ahren B: The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes
5. *Diabetes* 2004;53 Suppl 3:S215-S219.
167. Dray C, Debard C, Jager J, Disse E, Daviaud D, Martin P, Attane C, Wanecq E, Guigne C, Bost F, Tanti JF, Laville M, Vidal H, Valet P, Castan-Laurell I: Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans
3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E1161-E1169.
168. Greenwood FC, Landon J, Stamp TC: The plasma sugar, free fatty acid, cortisol, and growth hormone response to insulin. I. In control subjects
11. *J Clin Invest* 1966;45:429-436.
169. Reaux-Le Goazigo A., vear-Perez R, Zizzari P, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT, Llorens-Cortes C: Cellular localization of apelin and its receptor in the anterior pituitary: evidence for a direct stimulatory action of apelin on ACTH release
1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E7-15.
170. Liao YM, Qiao FY: [Expression of Apelin in placentas of patients with hypertensive disorders complicating pregnancy]
1. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2007;42:382-385.

171. Bortoff KD, Qiu C, Runyon S, Williams MA, Maitra R: Decreased maternal plasma apelin concentrations in preeclampsia
1. *Hypertens Pregnancy* 2012;31:398-404.
172. Van Mieghem T., van BR, Van HE, Pijnenborg R, Deprest J, Verhaeghe J: Maternal apelin physiology during rat pregnancy: the role of the placenta
1. *Placenta* 2010;31:725-730.
173. Gronberg M, Amini RM, Stridsberg M, Janson ET, Saras J: Neuroendocrine markers are expressed in human mammary glands
1. *Regul Pept* 2010;160:68-74.
174. Telejko B, Kuzmicki M, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Szamatowicz J, Nikolajuk A, Zonenberg A, Zwierz-Gugala D, Jelski W, Laudanski P, Wilczynski J, Kretowski A, Gorska M: Plasma apelin levels and apelin/APJ mRNA expression in patients with gestational diabetes mellitus
1. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:176-183.
175. Inuzuka H, Nishizawa H, Inagaki A, Suzuki M, Ota S, Miyamura H, Miyazaki J, Sekiya T, Kurahashi H, Udagawa Y: Decreased expression of apelin in placentas from severe pre-eclampsia patients
1. *Hypertens Pregnancy* 2013.
176. Cobellis L, De FM, Mastrogiacomo A, Giraldi D, Dattilo D, Scaffa C, Colacurci N, De LA: Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia-complicated placentas
1. *Histol Histopathol* 2007;22:1-8.
177. Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, Kitada C, Nishizawa N, Murosaki S, Kurokawa T, Onda H, Tatamoto K, Fujino M: Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum
1. *Biochim Biophys Acta* 1999;1452:25-35.
178. Aydin S: The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus
1. *Peptides* 2010;31:2236-2240.
179. Clee SM, Attie AD: The genetic landscape of type 2 diabetes in mice
23. *Endocr Rev* 2007;28:48-83.
180. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J: Evaluating the glucose tolerance test in mice
9. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E1323-E1332.
181. Igosheva N, Abramov AY, Poston L, Eckert JJ, Fleming TP, Duchon MR, McConnell J: Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes
2. *PLoS One* 2010;5:e10074.

182. Jungheim ES, Schoeller EL, Marquard KL, Louden ED, Schaffer JE, Moley KH: Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring
8. *Endocrinology* 2010;151:4039-4046.
183. Luzzo KM, Wang Q, Purcell SH, Chi M, Jimenez PT, Grindler N, Schedl T, Moley KH: High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects
1. *PLoS One* 2012;7:e49217.
184. Butruille L, Drougard A, Knauf C, Moitrot E, Valet P, Storme L, Deruelle P, Lesage J: The apelinergic system: Sexual dimorphism and tissue-specific modulations by obesity and insulin resistance in female mice
1. *Peptides* 2013;46C:94-101.
185. Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, Paakkonen M, Pirinen E, Alhava E, Akerman K, Herzig KH: Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding
1. *Regul Pept* 2005;130:7-13.
186. Heinonen MV, Laaksonen DE, Karhu T, Karhunen L, Laitinen T, Kainulainen S, Rissanen A, Niskanen L, Herzig KH: Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome
1. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19:626-633.
187. Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ, Garcia-Fuentes E: Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus
1. *Obes Surg* 2009;19:1574-1580.
188. Ramos MP, Crespo-Solans MD, del CS, Cacho J, Herrera E: Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness
11. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E318-E328.
189. Mayeur S. **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.** 10-11-2011.
Ref Type: Thesis/Dissertation
190. Kikuchi Y, Yamada M, Imakiire T, Kushiyama T, Higashi K, Hyodo N, Yamamoto K, Oda T, Suzuki S, Miura S: A Rho-kinase inhibitor, fasudil, prevents development of diabetes and nephropathy in insulin-resistant diabetic rats
1. *J Endocrinol* 2007;192:595-603.