



**HAL**  
open science

# Origines développementales des anomalies de l'homéostasie glucidique, de la croissance osseuse et prédisposition à l'ostéochondrose chez le poulain

Pauline Peugnet

► **To cite this version:**

Pauline Peugnet. Origines développementales des anomalies de l'homéostasie glucidique, de la croissance osseuse et prédisposition à l'ostéochondrose chez le poulain. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Paris Sud - Paris XI; Université de Liège. Faculté de médecine vétérinaire, 2014. Français. NNT : 2014PA11T092 . tel-01127253

**HAL Id: tel-01127253**

**<https://theses.hal.science/tel-01127253>**

Submitted on 7 Mar 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 :  
BIOSIGNE

Laboratoire : INRA - UMR1198 « Biologie du Développement et Reproduction

## THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

**Pauline PEUGNET**

Origines développementales des anomalies de  
l'homéostasie glucidique, de la croissance osseuse  
et prédisposition à l'ostéochondrose  
chez le poulain

Date de soutenance : 08/12/2014

**Composition du jury :**

Directeur de thèse :	Pascale CHAVATTE-PALMER	Directrice de recherches (INRA UMR1198)
Co-directeur de thèse :	Didier SERTEYN	Professeur (Université de Liège)
Rapporteurs :	Catherine VIGUIE	Professeur, Directrice de recherches (ENVT, INRA UMR 1131)
	Stefan DELEUZE	Professeur (Université de Liège)
Examineurs :	Marc LOMBES	Directeur de recherches (INSERM U693)
	Luc GROBET	Professeur (Université de Liège)



# Remerciements

Je tiens à remercier le Dr. Catherine Viguié et le Dr. Stefan Deleuze qui ont évalué la qualité de ce travail en endossant le rôle de rapporteur, le Dr. Marc Lombès qui a accepté de présider ce jury et le Dr. Luc Grobet, le Dr. Hélène Amory et le Dr. Michelle Nisolle qui y ont aussi participé. Merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture et à l'appréciation de ce manuscrit, ainsi que pour votre présence d'abord à Liège, puis à Jouy-en-Josas. Je tiens aussi à remercier le Dr. Béatrice Morio-Liondore et le Dr. Stéphane Schurmans qui ont accepté de participer au comité de thèse et de porter un regard extérieur sur ce travail.

Cette thèse, permanente remise en question, a exigé beaucoup d'énergie et de persévérance. Cette expérience a été extrêmement stimulante et vous êtes nombreux à avoir contribué à son succès : merci !

J'adresse un merci particulièrement chaleureux à ma directrice de thèse, le Dr. Pascale Chavatte-Palmer. Sans ton enthousiasme et ton dynamisme, ce travail ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui. Tu m'as guidée et encouragée avec beaucoup de patience. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, pour ta disponibilité tant pour répondre à mes questions de doctorante que sur le plan personnel, et ce malgré tes innombrables engagements aux quatre coins du monde. L'encadrement scientifique s'est doublé d'une réelle amitié.

Ma co-encadrante, le Dr. Anne Tarrade, a aussi beaucoup apporté à ce travail. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour l'intérêt que tu as porté à mes problématiques « équine », tes lumières, tes nombreuses relectures et propositions pour améliorer mon manuscrit et mes articles. Merci pour ton soutien et ton calme à toute épreuve tout au long de cette aventure riche en rebondissements.

Mes remerciements vont aussi à mon co-directeur de thèse, le Pr. Didier Serteyn, ainsi qu'à son équipe en les personnes du Dr. Jean-Philippe Lejeune, du Dr. Isabelle Caudron, de Brigitte Delière et de Luis Mendoza. Dans ce projet, vous avez été les acteurs essentiels du volet se rapportant à la santé ostéoarticulaire des poulains. Merci pour les allers-retours que vous avez pris le temps de faire entre Mont-le-Soie, Chamberet et Nouzilly afin de réaliser les nombreux clichés radiographiques et pour votre expertise dans leur lecture. Je remercie aussi le Dr. Charlotte Sandersen, qui a accepté de faire partie de mon comité de thèse en qualité de tutrice et qui m'a appris à réaliser un clamp chez un poulain.

Un grand merci aux équipes des stations expérimentales qui sont le fondement de ce projet ambitieux : l'équipe de la station de l'IFCE à Chamberet et à sa tête Laurence Wimel, ainsi que l'équipe de la jumenterie de l'INRA de Nouzilly, sous la responsabilité d'abord de Guy Duchamp, puis de Fabrice Reigner. Sans votre énorme travail auprès des animaux (non





seulement en termes de conduite d'élevage, mais aussi pour les nombreuses mesures et collectes d'échantillons et les interminables tests métaboliques tout au long de l'année) et sans votre disponibilité pour répondre à mes questions qui vous ont parfois obligé à fouiller dans les archives, ce projet n'aurait jamais abouti. A Chamberet, j'aimerais remercier en particulier Cédric Dubois pour son éternelle énergie et Joseph Bellonie pour son imperturbable patience. A nous trois, quelle efficacité au cours de ces longues heures hivernales passées dans l'attente du fameux « plateau », n'est-ce pas ? Je remercie aussi Marie-Jo Provost, pour les aspects logistiques, ainsi que Patrice Dupuy avec qui j'ai aussi interagi de temps en temps. A Nouzilly, j'aimerais remercier en particulier Philippe Barrière que j'ai beaucoup harcelé pour compléter mes tableurs, mais aussi l'ensemble de l'équipe, toujours de bonne humeur et enthousiaste pour participer aux manipes : François Stieau, Yvan Gaude, Jean-Marie Yvon, Thierry Gascogne et Thierry Blard.

Je ne m'en serais probablement jamais sortie sans l'aide précieuse de Michèle Dahirel. Nous avons traité une sacrée quantité d'échantillons à nous deux, pas vrai ? Ce sont de longues heures passées à les trier, à manier la pipette, à vérifier que le compteur est d'humeur à compter ou encore à évacuer la chambre froide, mais somme toute, ce sont de bons moments ! Merci à Marie-Christine Aubrière. Ton optimisme, ton expérience et tes coups de main m'ont aussi été très précieux.

J'adresse un merci spécial au Dr. Daniel Guillaume. Vous m'avez mis le pied à l'étrier de la recherche équine quand j'ai débarqué pour découvrir cet univers il y a un peu plus de cinq ans. Vous avez ensuite joué un rôle indispensable dans le volet métabolique de ce projet puisque vous avez réalisé l'ensemble des dosages d'insuline, et ce malgré un diamètre des tubes aliquotes pas toujours optimal. Merci aussi pour votre regard critique sur mes articles.

Merci au Dr. Sylvaine Camous, qui a apporté toute son expertise sur la leptine dans ce projet. Merci pour tout ce temps passé au laboratoire, mais aussi pour ton sens du détail qui a permis d'améliorer mes articles.

Je remercie le Pr. Stéphane Chaffaux. Merci pour vos remarques constructives. Votre expérience, vos connaissances bibliographiques et votre regard extérieur sur mon travail ont permis d'améliorer la qualité de mes articles et ont participé à aiguïser mon sens critique.

Par ailleurs, le projet FOETALIM et ma thèse sont le fruit d'un travail réalisé avec de nombreux partenaires dont le pôle d'analyses et de recherche LABEO Frank Duncombe, en les personnes du Dr. Eric Richard et de Marie-Pierre Toquet. Merci pour votre collaboration au projet, votre accueil au sein du laboratoire biochimie et votre expertise technique au cours des dosages des marqueurs du turn-over osseux. Merci aussi au Dr. Valérie Berthelot et à Françoise Ternois de l'unité INRA-AgroParis Tech « Modélisations Systémiques



Appliquées aux Systèmes d'Élevage » qui ont pris en charge les dosages d'acides gras non-estérifiés.

La réussite de ce projet doit aussi beaucoup à la participation d'étudiants venus de tous horizons. Sarah Valentino et Morgane Robles se sont succédé au service de la grande cause du placenta équin dans le cadre de leur Master 2. Je dois dire que vous êtes d'une efficacité redoutable quand vous vous y mettez, aucun doute que vos thèses seront des succès. Quand l'heure sera venue, j'espère vous convaincre que la rédaction du manuscrit, puis la soutenance, ce n'est pas si terrible (#FaitesCeQueJeDis #PasCeQueJeFais). Nous avons passé de bons moments ensemble, sur le terrain, au labo, au bureau, et trop rarement au dehors. J'y pense déjà avec nostalgie. Sandra Martin s'est concentrée sur les aspects de santé articulaire dans le cadre de sa thèse vétérinaire, a participé activement à la lecture des clichés radiographiques et a réalisé un travail très utile de synthèse bibliographique. Céline Houdard a pris en charge les clamps des poulains sevrés l'hiver dernier, aussi dans le cadre de sa thèse vétérinaire. Enfin, les étudiants étaient nombreux sur le terrain. Charly Brouillard a assuré la collecte des tout premiers placentas du projet et a su préparer le terrain alors que je ne faisais pas encore partie de l'aventure. Les années suivantes, Amélie Abrial et Mélissande Dalous ont participé aux collectes estivales intensives d'échantillons qui ont inévitablement suivi chaque saison de poulinages. Merci à tous !

Merci au Dr. Corinne Cotinot qui m'a accueillie au sein de l'unité BDR et à tous les autres membres de l'ER4 PEPPS que je n'ai pas encore cités : Delphine Rousseau, Christophe Richard, Hala Al Adhami, Laura Torres-Rovira, Marine Guinot, Josiane Aioun, Marie-Sylvie Lallemand et Pauline Léveillé. Vous avez suivi mes aventures entre la région parisienne, la Corrèze et la Touraine. Chacun d'entre vous a, un jour ou l'autre, joué un rôle particulier dans ma thèse, corrigé un diaporama, apporté un regard extérieur sur mon travail ou sur une situation, dit une parole réconfortante. Merci aussi pour tous les moments sympas, les pots, les pique-niques et les discussions de couloir. Un grand merci aussi à l'équipe de gestionnaires de l'unité, en particulier Benjamin Marchand, Céline Durandet et Corinne Ferreira, toujours disponibles pour débloquer une situation.

Merci à mes parents, témoins privilégiés de mes crises de doute aiguës. Merci de m'avoir soutenue/supportée, de m'avoir aidée à surmonter les moments difficiles et de m'avoir donné les moyens d'y arriver. Merci à toi Alex qui a eu la mauvaise idée de me rencontrer pendant ma thèse. Et oui, « s\*\*\* happens » comme tu te plais à le répéter avec élégance et philosophie ! Merci d'avoir subi les contraintes de ma thèse avec tant de patience, merci pour tes encouragements.

Ce projet est cofinancé par l'Institut français de Cheval et de l'Équitation et par le département « Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage » de l'Institut National de la Recherche Agronomique. Merci d'avoir permis la réalisation de ce travail.



# Sommaire

<b>Publications relatives aux travaux de thèse .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des illustrations .....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. Développement de l'unité fœto-placentaire et croissance post-natale chez l'équin .....</b>	<b>15</b>
1.1.1. Physiologie normale de l'unité fœto-placentaire et de la jument gravide.....	15
1.1.2. Physiologie normale de la jument allaitante .....	22
1.1.3. Croissance et développement normaux du poulain .....	27
<b>1.2. Insulinorésistance et ostéochondrose chez l'équin, dialogue entre les métabolismes énergétique et osseux .....</b>	<b>34</b>
1.2.1. Insulinorésistance chez l'équin .....	34
1.2.2. Ostéochondrose chez l'équin.....	39
1.2.3. Dialogue entre les métabolismes énergétique et osseux.....	45
<b>1.3. Origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte chez l'équin .</b>	<b>50</b>
1.3.1. Concepts d'origines fœtales de la santé .....	50
1.3.2. Origines fœtales des anomalies de l'homéostasie glucidique et du squelette .....	53
1.3.3. Origines fœtales de la santé et des performances chez l'équin .....	56
<b>1.4. Objectifs de la thèse .....</b>	<b>64</b>
1.4.1. Problématique de la thèse .....	64
1.4.2. Approche retenue et étapes de la thèse.....	64
<b>2. Travaux.....</b>	<b>66</b>
<b>2.1. Protocole expérimental .....</b>	<b>67</b>
2.1.1. Modèles expérimentaux .....	67
2.1.2. Etat corporel et homéostasie énergétique des juments .....	71
2.1.3. Fonction de transfert du placenta à terme.....	73
2.1.4. Croissance des poulains .....	74
2.1.5. Homéostasie énergétique des poulains.....	75
2.1.6. Statut ostéoarticulaire des poulains .....	76



<b>2.2. Article: “Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses”.....</b>	<b>78</b>
<b>2.3. Article: “Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in post-weaning horses”.....</b>	<b>96</b>
<b>2.4. Article: “Longitudinal study of growth and osteoarticular status in foals born to between-breed embryo transfers”.....</b>	<b>133</b>
<b>2.5. Article: “Intra-uterine growth enhancement or restriction after between-breed embryo transfer is associated with structural and functional alterations of the equine term placenta”.....</b>	<b>178</b>
<b>2.6. Article: “Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status in pre-weaning horses”.....</b>	<b>209</b>
<b>3. Synthèse, limites et perspectives.....</b>	<b>243</b>
<b>3.1. Synthèse des modèles.....</b>	<b>243</b>
3.1.1. Modèle 1 : transferts d’embryons entre races de tailles différentes.....	243
3.1.2. Modèle 2 : apport d’orge dans la ration de la jument gravide.....	246
<b>3.2. Limites des modèles.....</b>	<b>247</b>
3.2.1. Choix des méthodes de reproduction.....	247
3.2.2. Interaction entre les environnements anté- et post-nataux.....	249
3.2.3. Gestion de l'alimentation des poulains.....	251
<b>3.3. Perspectives.....</b>	<b>254</b>
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>258</b>
<b>Références.....</b>	<b>259</b>





## Publications relatives aux travaux de thèse

### Articles originaux

**Peugnet P**, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, Dahirel M, Dubois C, Jouneau L, Reigner F, Berthelot V, Chaffaux S, Tarrade A, Serteyn D, Chavatte-Palmer P. **Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses.** *PLoS ONE* 2014;9(7):e102044.

**Peugnet P**, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, Dahirel M, Dubois C, Reigner F, Berthelot V, Chaffaux S, Tarrade A, Serteyn D, Chavatte-Palmer P. **Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in post-weaning horses.** *PLoS ONE* (en préparation).

**Peugnet P**, Mendoza L, Wimel L, Duchamp G, Dubois C, Reigner F, Caudron I, Deliège B, Toquet MP, Sandersen C, Chaffaux S, Tarrade A, Richard E, Lejeune JP, Serteyn D, Chavatte-Palmer P. **Longitudinal study of growth and osteoarticular status in foals born to between-breed embryo transfers.** *Journal of Animal Science* (en préparation).

**Peugnet P**, Valentino S, Robles M, Dahirel M, Aubrière MC, Wimel L, Duchamp G, Chaffaux S, Dubois C, Reigner F, Serteyn D, Tarrade A, Chavatte-Palmer P. **Intra-uterine growth enhancement or restriction after between-breed embryo transfer is associated with structural and functional alterations of the equine term placenta.** *Theriogenology* (en préparation).

**Peugnet P**, Robles M, Mendoza L, Wimel L, Dubois C, Dahirel M, Guillaume D, Camous S, Berthelot V, Toquet MP, Richard E, Sandersen C, Chaffaux S, Lejeune JP, Tarrade A, Serteyn D, Chavatte-Palmer P. **Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status in pre-weaning horses.** *PLoS ONE* (soumis).

### Communications orales dans des colloques à comité de lecture

**Peugnet P**, Robles M, Wimel L, Dahirel M, Guillaume D, Richard E, Camous S, Serteyn D, Tarrade A, Chavatte-Palmer P. **Feeding pregnant mares with concentrates has no impact on pre-weaning foal growth and glucose metabolism.** 7<sup>th</sup> European Workshop on Equine Nutrition, 28/09/2014-02/10/2014, Leipzig, Allemagne.



**Peugnet P**, Valentino S, Robles M, Tarrade A, Dahirel M, Guillaume D, Wimel L, Duchamp G, Reigner F, Chaffaux S, Sertheyn D, Chavatte-Palmer P. **Long term growth and glucose metabolism perturbations in foals after manipulation of fetal nutrition by between-breed embryo transfer.** 7<sup>th</sup> European Workshop on Equine Nutrition, 28/09/2014-02/10/2014, Leipzig, Allemagne.

**Peugnet P**, Tarrade A, Dahirel M, Guillaume D, Wimel L, Duchamp G, Reigner F, Chaffaux S, Sertheyn D, Chavatte-Palmer, P. **Long term growth and glucose metabolism perturbations after between-breed embryo transfer in foals.** Australasian Equine Science Symposium, 18-20/07/2014, Gold Coast, Australia. Proceedings of the AESS 5 (2014), p.36.

**Peugnet P**, Robles M, Wimel L, Dahirel M, Guillaume D, Camous S, Sertheyn D, Tarrade A, Martin-Rosset W, Chavatte-Palmer P. **Feeding pregnant mares with concentrates has no impact on pre-weaning foals growth and glucose metabolism.** Australasian Equine Science Symposium, 18-20/07/2014, Gold Coast, Australia. Proceedings of the AESS 5 (2014), p.44.

**Peugnet P**, Tarrade A, Dahirel M, Chaffaux S, Guillaume D, Wimel L, Duchamp G, Reigner F, Sandersen C, Sertheyn D, Chavatte-Palmer P. **Programmation fœtale des anomalies du métabolisme glucidique, de la croissance osseuse et de la prédisposition à l'ostéochondrose chez le poulain.** 40<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Equine, 18/03/2014, Paris, France. Actes de Colloque de la 40<sup>ème</sup> JRE (2014), p.34-43.

Valentino S, **Peugnet P**, Tarrade A, Wimel L, Reigner F, Sertheyn D, Chavatte-Palmer P. **Intrauterine growth restriction is associated with strong alterations in placental structure and function in horses.** XI<sup>th</sup> International Symposium on Equine Reproduction, 26-31/01/2014, Hamilton, Nouvelle-Zélande. Journal of Equine Veterinary Science 34 (2014), p.223.

**Peugnet P**, Guillaume D, Wimel L, Duchamp G, Reigner F, Sandersen C, Sertheyn D, Chavatte-Palmer C. **Long term adaptations in glucose metabolism after increased or restricted fetal growth in horses.** XI<sup>th</sup> International Symposium on Equine Reproduction, 26-31/01/2014, Hamilton, Nouvelle-Zélande. Journal of Equine Veterinary Science 34 (2014), p.224.

**Peugnet P**, Tarrade A, Dahirel M, Chaffaux S, Guillaume D, Wimel L, Duchamp G, Reigner F, Sandersen C, Sertheyn D, Chavatte-Palmer P. **Programmation in utero de la croissance et de la sensibilité à l'insuline du poulain.** 41<sup>ème</sup> Journées Annuelles de l'Association des Vétérinaires Equins Français, 11-13/12/13, Deauville, France. Actes des 41<sup>ème</sup> Journées Annuelles de l'AVEF (2013), 2p.

**Peugnet P**, Tarrade A, Dahirel M, Guillaume D, Wimel L, Duchamp G, Reigner F, Sertheyn D, Chavatte-Palmer P. **Growth and glucose metabolism changes in foals after enhancement of**



**the fetal growth by embryo transfer.** 39<sup>th</sup> *International Embryo Transfer Society Annual Conference, 19-22/01/2013, Hannovre, Allemagne.* *Reproduction, Fertility and Development* 25 (2013), p.228.

**Peugnet P**, Tarrade A, Chaffaux S, Guillaume D, Wimel L, Duchamp G, Reigner F, SerTEYN D, Chavatte-Palmer P. **In utero programming of the postnatal growth and insulin sensitivity after between-breeds embryo transfers in the horse.** 28<sup>th</sup> *Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, 07-08/09/2012, Saint Malo, France.* *Proceedings of the EETA Scientific Meeting* (2012), p.196.

## Affiches dans des colloques avec comité de lecture

**Peugnet P**, Valentino S, Robles M, Dahirel M, Aubrière MC, Wimel L, Duchamp G, Chaffaux S, Dubois C, Reigner F, SerTEYN D, Tarrade A, Chavatte-Palmer P. **Intrauterine growth enhancement and restriction are associated with alterations in term placenta morphology, morphometry and function in horses.** 2014 *International Federation of Placenta Associations Meeting, 09-12/09/2014, Paris, France.*

Wimel L, **Peugnet P**, Reigner F, Chaffaux S, Sandersen C, SerTEYN D, Chavatte-Palmer P. **Postnatal growth after between-breeds embryo transfer in horses.** XI<sup>th</sup> *International Symposium on Equine Reproduction, 26-31/01/2014, Hamilton, Nouvelle-Zélande.* *Journal of Equine Veterinary Science* 34 (2014), p.230.

**Peugnet P**, Valentino S, Tarrade A, Wimel L, Reigner F, SerTEYN D, Chavatte-Palmer P. **Intrauterine growth restriction after between-breed embryo transfer is associated with strong alterations in placental structure and function in horses.** 40<sup>th</sup> *International Embryo Transfer Society Annual Conference, 11-14/01/2013, Reno, Nevada, USA.* *Reproduction, Fertility and Development* 26 (2014) p.150-151.

**Peugnet P**, Tarrade A, Guillaume D, Wimel L, Duchamp G, Camous S, Chaffaux S, Lejeune JP, Reigner F, Sandersen C, SerTEYN D, Chavatte-Palmer P. **In utero programming of the postnatal growth and insulin sensitivity after between-breeds transfers in the horse.** *General Meeting of Epiconcept, Epigenetics and Periconception Environment, 24-25/04/2013, Antalya, Turkey.* *Proceedings of the EPICONCEPT Workshop* (2013), p.109.



# Liste des illustrations

## Liste des figures

**Figure 1.** Conceptus équin à 12 jours post-ovulation (photographie du Pr. Betteridge dans Allen et Stewart, 2001).

**Figure 2.** Conceptus équin à 36 jours post-ovulation (Allen et Stewart, 2001).

**Figure 3.** Schéma et photographie du conceptus équin et de ses membranes à 36 jours post-ovulation (Ginther, 1998).

**Figure 4.** Cupules endométriales dans la corne gravide de la jument (d'après Allen et Stewart, 2001).

**Figure 5.** Coupe transversale de l'interface allantochorion-endomètre chez une jument gravide à 60 jours post-ovulation (d'après Allen et Stewart, 2001).

**Figure 6.** Schéma de la structure et de la vascularisation des microcotylédons et des aréoles dans le placenta équin (d'après Steven et Samuel, 1975).

**Figure 7.** Profils hormonaux de la gestation chez la jument (d'après Ginther, 1992 dans Blanchard et al, 2005 et d'après Fowden et al, 2008b).

**Figure 8.** Coupes transversales schématiques de la glande mammaire et d'une alvéole mammaire chez la jument (d'après Davies Morel, 2008).

**Figure 9.** Concentrations sanguines maternelles en prolactine, GH et IGF-I chez la jument de race Lipizzan gravide puis allaitante et chez la jument non-allaitante (d'après Heidler et al, 2003).

**Figure 10.** Variations de la composition du lait de jument en cours de lactation (d'après une métanalyse de Doreau et Boulot, 1989).

**Figure 11.** Utilisation de l'énergie métabolisable ingérée : répartition entre les besoins d'entretien, de lactation et la reconstitution des réserves corporelles (Doreau, 1994).

**Figure 12.** Evolution du poids vif et de la hauteur au garrot du cheval de selle en fonction de l'âge (Martin-Rosset, 2012).





**Figure 13.** Croissance relative des différentes régions du squelette par rapport au squelette total de la naissance à 30 mois (d'après Martin-Rosset et al, 1980 et Martin-Rosset, 2005 dans Martin-Rosset, 2012).

**Figure 14.** Développement et croissance longitudinale de l'os par ossification enchondrale (d'après Mackie et al, 2011).

**Figure 15.** Coupe transversale schématique de l'épiphyse (d'après Ytrehus et al, 2007).

**Figure 16.** Effet du niveau des apports alimentaires sur le poids vif de poulains de race selle au cours de trois hivers entre 6 et 42 mois (d'après Bigot et al, 1987 et Trillaud-Geyl et al, 1990 dans Martin-Rosset, 2012).

**Figure 17.** Croissance compensatrice estivale et croissance hivernale chez des poulains de race selle de 6 à 42 mois (d'après Bigot et al, 1987 et Trillaud-Geyl et al, 1990 dans Martin-Rosset, 2012).

**Figure 18.** Contrôle de l'homéostasie énergétique par les organes (d'après Saltiel et al, 2001).

**Figure 19.** Schéma des mécanismes intracellulaires de réponse à l'insuline (d'après Leto et Saltiel, 2012).

**Figure 20.** Coupe sagittale d'un pied de cheval normal, en début de fourbure et présentant une fourbure grave.

**Figure 21.** Photographie d'un poney obèse et d'un cheval très maigre (d'après Johnson et al, 2009).

**Figure 22.** Schémas de la coupe transversale de l'épiphyse au cours de l'ossification enchondrale (d'après Ytrehus et al, 2007).

**Figure 23.** Images radiographiques de lésions d'ostéochondrose disséquante dans un boulet antérieur, un jarret et un grasset (d'après van der Heyden et al, 2008).

**Figure 24.** Variations de la concentration sérique en ostéocalcine, en isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline et en hydroxyproline en fonction de l'âge et du statut ostéoarticulaire (d'après Valette et al, 2007).

**Figure 25.** Conséquences de la mutation ob/ob (absence de sécrétion de leptine) et de la mutation db/db (absence de signal leptinique) (Karsenty, 2001).



**Figure 26.** Contrôle de la résorption et de la formation osseuse par la leptine (d'après Wei et Ducey, 2010).

**Figure 27.** Contrôle de l'homéostasie glucidique par l'ostéoblaste *via* l'ostéocalcine et contrôle de l'ostéocalcine par la leptine (d'après Wei et Ducey, 2010).

**Figure 28.** Périodes critiques de programmation développementale chez les rongeurs et l'Homme (d'après une méta-analyse de Fowden et al, 2006a).

**Figure 29.** Retard de croissance intra-utérin et action de l'insuline chez l'Homme (d'après Gatford et al, 2008).

**Figure 30.** Schéma des modifications épigénétiques du promoteur du gène *Pdx1* impliquées dans le développement du diabète de type II chez le rat (d'après Park et al, 2008).

**Figure 31.** Acquisition de la masse osseuse au cours de la vie (d'après Dennison et al, 2013).

**Figure 32.** Représentation graphique d'études mesurant la corrélation entre le poids de naissance et le contenu minéral osseux de la hanche chez l'adulte (d'après Dennison et al, 2013).

**Figure 33.** Compétition pour l'attachement du placenta en cas de gestation gémellaire (d'après Jeffcott et Whitwell, 1973 dans Rosedale et Ousey, 2002).

**Figure 34.** Parents et poulains des croisements réciproques entre des poneys Shetland et des chevaux de trait de race Shire (d'après Walton et Hammond, 1938).

**Figure 35.** Photographies des poulains issus des transferts inter-races le lendemain de leur naissance (d'après Allen et al, 2002).

**Figure 36.** Photographies des poulains issus des transferts inter-races à l'âge de 14 mois (d'après Allen et al, 2004).

**Figure 37.** Modèle 1 : transferts d'embryons entre races de tailles différentes.

**Figure 38.** Modèle 2 : apport de concentré dans la ration de la jument gravide.

**Figure 39.** Système français de notation de l'état corporel des chevaux (d'après Arnaud, 2012).

**Figure 40.** Photographie de l'allantochoirion à terme d'une jument de trait.



**Figure 41.** Photographie d'une coupe transversale de l'allantochorion équin à terme et agrandissement des villosités microcotylédonnaires.

**Figure 42.** Schéma d'une analyse stéréologique sur un échantillon d'allantochorion à terme.

**Figure 43.** Schéma des mensurations réalisées chez les poulains.

## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Composition moyenne du lait au cours de la lactation de la jument (d'après Davies Morel, 2008).

**Tableau 2.** Effet du format de la jument sur le poids vif du poulain à la naissance (d'après Walton et Hammond, 1938 et Flade, 1965 dans Martin-Rosset, 2012).

**Tableau 3.** Variation de la croissance relative des tissus chez différentes races de trait entre 12 et 30 mois (d'après Martin-Rosset et al, 1983 dans Martin-Rosset, 2012).

**Tableau 4.** Variations de la croissance relative des tissus chez les mâles et les femelles de différentes race trait entre 12 et 30 mois (d'après Martin-Rosset et al, 1983 et Martin-Rosset, 2012).

**Tableau 5.** Définition du syndrome métabolique par l'*International Diabetes Federation* (d'après IDF, 2014).

**Tableau 6.** Concentrations sériques en ostéocalcine, isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline et hydroxyproline de la naissance à 6 mois chez 116 poulains sans lésion articulaire (sains) ou avec des lésions articulaires sévères (atteints) et de 7 à 18 mois chez 262 poulains sains et atteints (d'après Valette et al, 2007).

**Tableau 7.** Concentration synoviale en CTX-II en fonction de l'âge d'une part et de la sévérité de la boiterie d'autre part, chez des chevaux de races American Saddlebred, Pur-Sang, Quarter Horse, Arabe, American Paint Horse (d'après Fyfe, 2012).

**Tableau 8.** Pathologies de l'adulte associées à un développement intra-utérin suboptimal chez l'Homme (d'après une méta-analyse de Fowden et al, 2006a).

**Tableau 9.** Prévalence du diabète selon le poids de naissance et l'indice de masse corporelle dans une population de 1 179 indiens pimas (d'après McCance et al, 1994).

**Tableau 10.** Techniques de reproduction en France en 2013 (d'après IFCE, 2014).



**Tableau 11.** Pratique du transfert d'embryons dans le monde en 2013 (d'après IETS, 2013).

**Tableau 12.** Modes de reproduction artificielle autorisés ou non en fonction des races d'équidés en France. Situation en octobre 2003 (d'après Blanchard, 2005).

**Tableau 13.** Etablissement des lots témoins et expérimentaux du modèle 1.

**Tableau 14.** Dates d'établissement des gestations témoins par insémination artificielle et expérimentales par transferts d'embryons pour le modèle 1 dans chaque station et à chaque saison de reproduction.

**Tableau 15.** Dates de naissance des poulains témoins et expérimentaux pour le modèle 1 dans chaque station et à chaque saison de reproduction.

**Tableau 16.** Etablissement des lots du modèle 2.

**Tableau 17.** Principales différences observées entre les races poney et selle dans le cadre du modèle 1 de transferts d'embryons inter-races.

**Tableau 18.** Principaux effets du transfert d'embryon en jument de trait chez le poulain de race poney et en ponette chez le poulain de race selle.

**Tableau 19.** Principaux effets de l'apport d'orge dans la ration hivernale de la jument gravide chez le poulain de race selle.





## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADRβ2	récepteur adrénergique β2
AKT	protéine kinase B
AOAJ	affections ostéoarticulaires juvéniles
AP-1	<i>activator protein 1</i>
AQPS	autre que Pur-Sang
AR	<i>androgens receptor</i>
AS160	<i>160 kDa AKT substrate</i>
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CART	<i>cocaine and amphetamine-regulated transcript</i>
clamps HE	clamps hyperinsulinémique euglycémique
CMO	contenu mineral osseux
COX-2	cyclo-oxygénase 2
CTX-II	carboxy-télopeptide du collagène de type II
DMO	densité minérale osseuse
DOHaD	<i>developmental origins of health and disease</i>
eCG	<i>equine chorionic gonadotropin</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMS	<i>equine metabolic syndrome</i>
Er <sub>α</sub> , ER <sub>β</sub>	<i>estrogens receptor α, β</i>
FoxO1	<i>forkhead box protein O1</i>
FSH	<i>follicle stimulating hormone</i>
GH	<i>growth hormone</i>
GHIH	<i>GH inhibiting hormone</i>
GHR	<i>GH receptor</i>
GHRH	<i>GH releasing hormone</i>
GLUT4	<i>glucose transporter 4</i>
GMQ	gain moyen quotidien
GR	<i>glucocorticoids receptor</i>
GSV	<i>GLUT storage vesicles</i>
IA	insémination artificielle
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
IFCE	Institut Français du Cheval et de l'Équitation
Ig	immunoglobulins
IGFBP	<i>IGF binding proteins</i>
IGF-I, IGF-II	<i>insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II</i>



IGF-IR	<i>IGF-I receptor</i>
Il-6	interleukine 6
IMC	indice de masse corporelle
INF	<i>glucose infusion rate</i>
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IOF	<i>International Osteoporosis Foundation</i>
IR	insulinorésistance
IRA	image radiologiquement anormale
IRAc	IRA à expression clinique certaine
IRAi	IRA à expression clinique incertaine
IRAp	IRA à expression clinique probable
IRS	image radiologiquement suspecte
IRS-1	<i>insulin receptor substrate-1</i>
IVGTT	<i>intravenous glucose tolerance test</i>
jpo	jours post-ovulation
LH	<i>luteinizing hormone</i>
lot C	lot « concentré »
lot F	lot « fourrages »
lot P-P	lot « poney dans poney »
lot P-T	lot « poney dans trait »
lot S-P	lot « selle dans poney »
lot S-S	lot « selle dans selle »
lot S-T	lot « selle dans trait »
lot T-T	lot « trait dans trait »
M	<i>glucose metabolism rate</i>
MAT	matière azotée totale
MG	matière grasse
MMP-2, MMP-9	métalloprotéinase 2, 9
mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
NRC	<i>National Research Council</i>
ObRb	récepteur de la leptine
OC	ostéochondrose
OCD	ostéochondrite disséquante
OST-PTP	<i>osteotesticular-protein tyrosine phosphatase</i>
PAL <sub>h</sub> , PAL <sub>o</sub>	isoenzyme hépatique de la PAL, isoenzyme osseuse de la PAL
PAL <sub>tot</sub>	phosphatase alcaline totale
PDK1	<i>phosphatidylinositol-3 dependent kinase 1</i>
PGF <sub>2α</sub> , PGE <sub>2</sub>	prostaglandine F <sub>2α</sub> , prostaglandine E <sub>2</sub>
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate



POMC	proopiomélanocortine
PPID	<i>pituitary pars intermedia dysfunction</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand</i>
RBP4	<i>retinol binding protein 4</i>
RCIU	retard de croissance intra-utérin
RGC	<i>RAL-GAP complex</i>
SC	<i>space correction factor</i>
SLC2A4	<i>solute carrier family 2 member 4</i>
SNS	système nerveux sympathique
SO	surface osseuse
T <sub>3</sub>	triiodothyronine
T <sub>4</sub>	thyroxine
TE	transfert d'embryon
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TR <sub><math>\alpha</math>1</sub> , TR <sub><math>\beta</math>1</sub>	<i>T<sub>3</sub> receptors <math>\alpha</math>1, <math>\beta</math>1</i>
UEPAO	Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière
VEGF	<i>vascular endothelial</i>



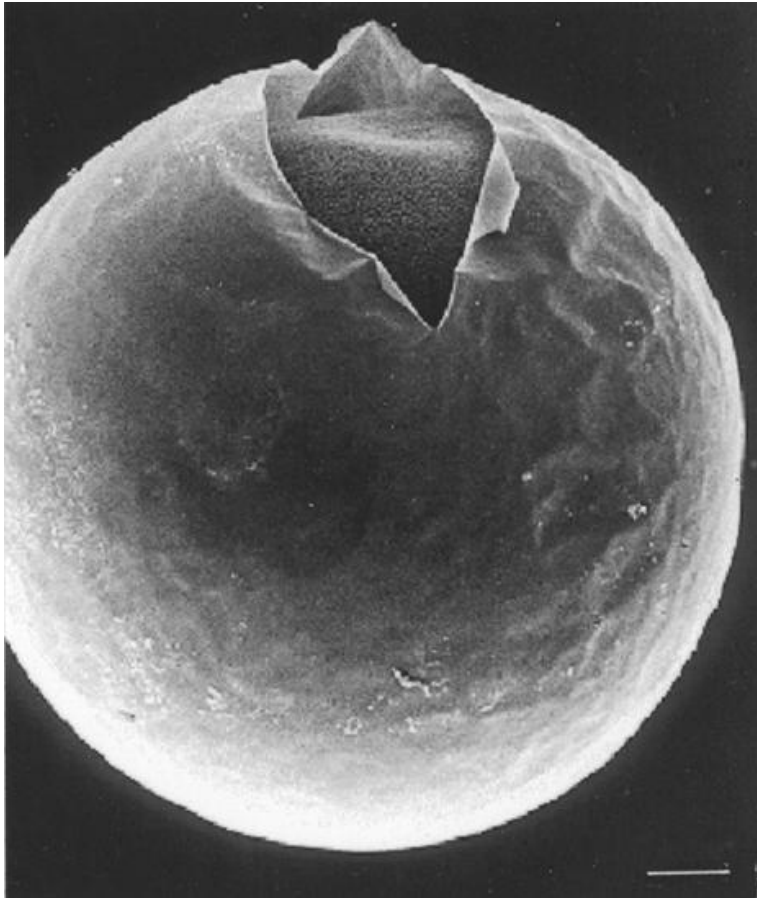
# 1. Introduction

Formulée à la fin des années 80 en médecine humaine, l'hypothèse des origines développementales de la santé et des maladies ou DOHaD (*developmental origins of health and disease*) a permis de relier les événements précoces du développement à un ensemble de pathologies chez l'adulte. La plasticité des tissus de l'individu au cours de la vie fœtale et des premières années suivant la naissance font de l'environnement intra-utérin et périnatal un facteur déterminant de sa santé future. En effet, les perturbations des conditions dans lesquelles le fœtus se développe programment les tissus afin d'assurer sa survie à court terme. Mais cette malprogrammation intra-utérine cause des altérations permanentes des structures et des fonctions, susceptibles de favoriser l'apparition de maladies métaboliques à l'âge adulte.

L'étude des origines développementales de la santé et des maladies est particulièrement pertinente chez le cheval destiné à des performances sportives exigeantes. Un squelette en bonne santé est une priorité pour cet athlète de haut niveau et trouve son origine dans la croissance. Fortement consommateur en énergie, le squelette est sensible aux variations du métabolisme glucidique. Or, de rares travaux expérimentaux (à l'échelle des quelques 135 000 publications sur le sujet) ont validé l'existence d'une programmation intra-utérine de l'homéostasie glucidique du poulain nouveau-né et une unique étude épidémiologique a confirmé l'origine fœtale des affections ostéoarticulaires du jeune cheval. L'étude à plus long terme de ces premiers éléments a motivé les travaux présentés dans cette thèse. J'introduirai les fondements de ces travaux en trois parties.

- La partie **1.1** pose les bases physiologiques et endocrinologiques du développement de l'unité fœto-placentaire (**1.1.1**) et de la croissance post-natale du poulain (**1.1.2** et **1.1.3**). Cette partie s'attarde sur l'impact des apports alimentaires sur la physiologie de la jument successivement gravide puis allaitante et du poulain en croissance.
- Après avoir fait le point sur l'insulinorésistance (**1.2.1**) et l'ostéochondrose (**1.2.2**) chez le cheval, la partie **1.2** établit la connexion entre homéostasie énergétique et osseuse, en particulier dans le cadre de ces deux affections (**1.2.3**).
- La partie **1.3** introduit la notion d'origines développementales de la santé et des maladies et la notion de fenêtre de susceptibilité, la gestation et la croissance étant deux périodes de plasticité des tissus aux *stimuli* environnementaux (**1.3.1**). Quelques exemples en faveur d'une origine fœtale des anomalies de l'homéostasie glucidique et osseuse sont présentés (**1.3.2**). Le concept de programmation du phénotype adulte est replacé dans le contexte particulier du cheval athlète (**1.3.3**).
- L'ensemble de ces éléments permet de formuler la problématique de cette thèse dans la partie **1.4**.





**Figure 1.** Conceptus équin à 12 jours post-ovulation. La capsule est déchirée et des sécrétions des glandes endométriales (« lait utérin ») sont visibles à la surface de la capsule. L'échelle représente 0,2 cm (photographie du Pr. Betteridge dans Allen et Stewart, 2001).

## 1.1. Développement de l'unité foëto-placentaire et croissance post-natale chez l'équin

### 1.1.1. Physiologie normale de l'unité foëto-placentaire et de la jument gravide

#### 1.1.1.1. Durée de la gestation

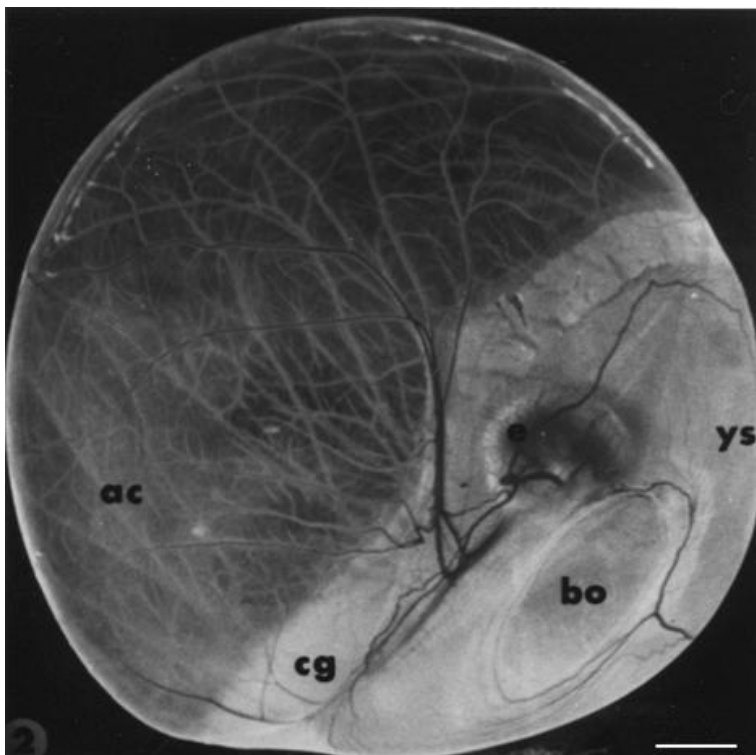
La gestation de la jument dure en moyenne 335 à 342 jours (11 mois) mais peut varier de 310 à 374 jours (Rossdale et Ricketts, 1983). La saison de saillie est le principal facteur de variabilité de la durée de gestation : les gestations commencées en hiver et au printemps sont plus longues de 5 à 10 jours que celles commencées en été et en automne. D'autre part, les juments bien nourries ont une gestation plus courte de 4 jours que les juments recevant une ration d'entretien et les poulains mâles seraient portés 2-3 jours de plus que les poulains femelles. Enfin, des différences entre races existent : les ponettes ont souvent une gestation plus courte que les juments de selle (Howell et Rollins, 1951; Rollins et Howell, 1951; Perez et al, 2003; Meliani et al, 2011). *Pour revue (Bernardeau et al, 2008).*

#### 1.1.1.2. Reconnaissance de la gestation et développement des membranes foëtales

##### 1.1.1.2.1 Mobilité du conceptus et reconnaissance de la gestation

L'ovocyte est fécondé dans l'oviducte environ 12 heures post-ovulation. La morula ou le jeune blastocyste entre dans l'utérus à 6-7 jours post-ovulation (jpo) (Battut et al, 1997). Puis le trophoctoderme sécrète des glycoprotéines riches en résidus thréonine et sérine qui, piégées par la zone pellucide, forment la capsule blastocytaire (**Figure 1**) (Flood et al, 1979; Oriol et al, 1993). Elle persiste jusqu'à 20-21 jpo et a au moins quatre fonctions. *Primo*, elle prévient l'élongation du trophoblaste en le maintenant dans une configuration sphérique (Ginther, 1983b). *Secundo*, elle permet à l'embryon de supporter la pression du myomètre qui le propulse à travers l'utérus (Stout et al, 2005). *Tertio*, elle se comporte comme une barrière contre les micro-organismes et protège l'embryon de la reconnaissance immunologique maternelle (Gygax et al, 1979; Stout et al, 2005). *Quarto*, elle régulerait les mouvements de l'embryon *in utero*, mais aussi l'accumulation et l'assimilation des sécrétions des glandes de l'endomètre (« lait utérin ») par l'embryon : elles sont sa principale source de nutriments jusqu'à l'implantation à 40 jpo (§1.1.1.3.2).

La vésicule embryonnaire reste mobile sous l'action des contractions péristaltiques du myomètre jusqu'à 16-17 jpo : elle passe d'une corne à l'autre 10 à 20 fois par jour, assure la reconnaissance de la gestation par l'ensemble de l'utérus et le maintien du corps jaune primaire (§1.1.1.4.1). Par la suite, son diamètre ne lui permet plus de circuler dans l'utérus et l'augmentation du tonus du myomètre la fixe à la base d'une des deux cornes utérines (Ginther, 1983a). A ce stade, la vésicule embryonnaire mesure environ 22 mm (Butterfield et



**Figure 2.** Conceptus équin à 36 jours post-ovulation avec la ceinture chorionique (cg) à la jonction de l'allantochorion (ac) en développement et du sac vitellin (ys) en régression et avec la petite surface d'omphalopleure (bo) qui persiste après développement du mésoderme. L'échelle représente 1,5 cm (Allen et Stewart, 2001).

Matthews, 1979). *Pour revue (Chavatte, 1995; Allen et Stewart, 2001; Bernardeau et al, 2008; Allen et Wilsher, 2009; Katila, 2011; Meira et al, 2012).*

#### **1.1.1.2.2. Fixation du conceptus et développement des membranes fœtales**

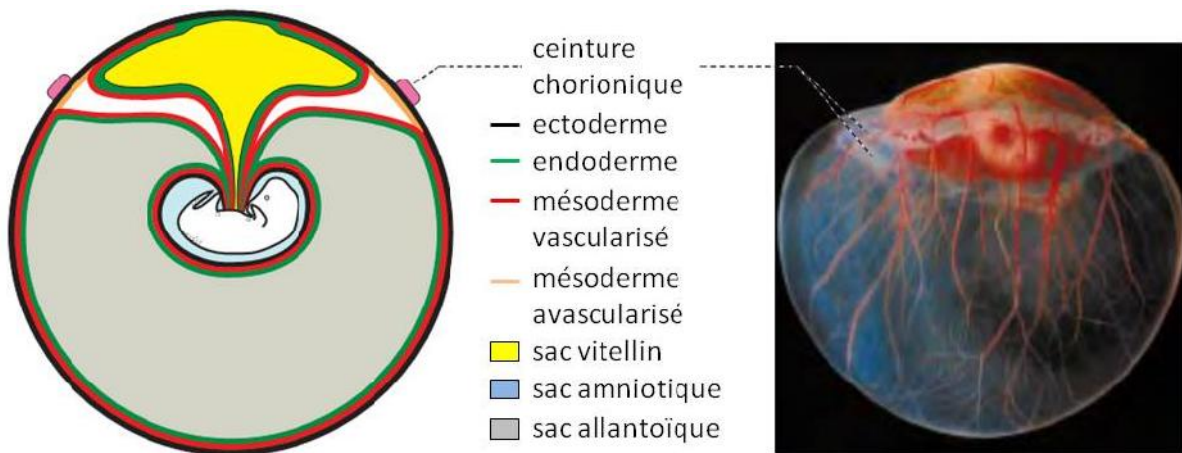
La capsule se désintègre progressivement à partir de 21 jpo, probablement sous l'action d'enzymes protéolytiques sécrétées par les cellules du trophoblaste et/ou de l'épithélium endométrial (Flood et al, 1982; Denker, 1987; Oriol et al, 1993). Les cellules trophoblastiques se développent sur la membrane choriovitelline externe et dans les glandes endométriales, ce qui constitue une première forme d'adhérence du conceptus à l'endomètre et optimise l'absorption de « lait utérin » par ce dernier (van Niekerk et Allen, 1975). A 20 jpo, l'embryon est visible à un pôle du conceptus et, à 23 jpo, ses battements cardiaques sont détectables par échographie (Chevalier et Palmer, 1982).

L'allantoïde se forme à partir de la partie postérieure de l'intestin embryonnaire (Ewart, 1915), croît rapidement jusqu'à envelopper l'embryon et fusionne avec le chorion pour former l'allantochorion. Ce dernier deviendra le placenta (§1.1.1.3.2) (Ginther, 1992a). Le mésoderme vascularisé se développe jusqu'à 35 jpo où il enveloppe tout le conceptus, sauf un petit cercle d'omphalopleure (membrane embryonnaire composée pour partie du sac vitellin) destiné à devenir le point d'attachement du cordon ombilical (**Figure 2**). A 45 jpo, l'allantoïde remplace totalement le sac vitellin. Ce dernier s'incorpore à la base du cordon ombilical qui s'allonge à partir de 40 jpo (Ginther, 1992a). Comme chez les autres mammifères, l'ectoderme se différencie en épiderme, muqueuses et système nerveux, le mésoderme se différencie en derme, muscles, os, reins, glandes surrénales et glandes génitales et l'endoderme se différencie en système digestif et ses glandes annexes et en système respiratoire (Beaumont et Cassier, 1982; Gilbert, 1997). En 1 mois, l'organogenèse est complète et, à 35 jpo, l'embryon devient un fœtus (van Niekerk et Allen, 1975). A 55-60 jpo, le fœtus occupe l'ensemble de la corne gravide et du corps utérin. *Pour revue (Chavatte, 1995; Allen et Stewart, 2001; Bernardeau et al, 2008; Allen et Wilsher, 2009; Meira et al, 2012).*

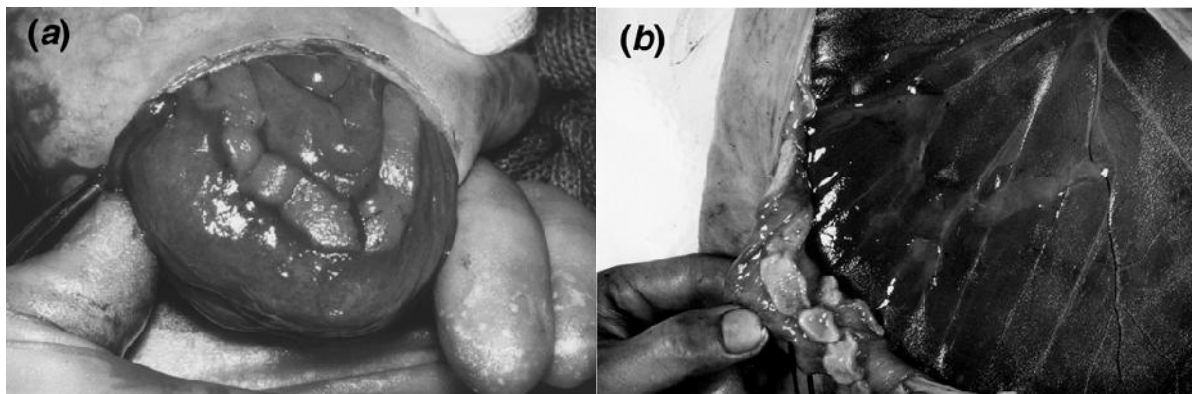
#### **1.1.1.3. Implantation et développement placentaire**

Le trophoblaste équien est composé de deux types cellulaires aux fonctions distinctes :

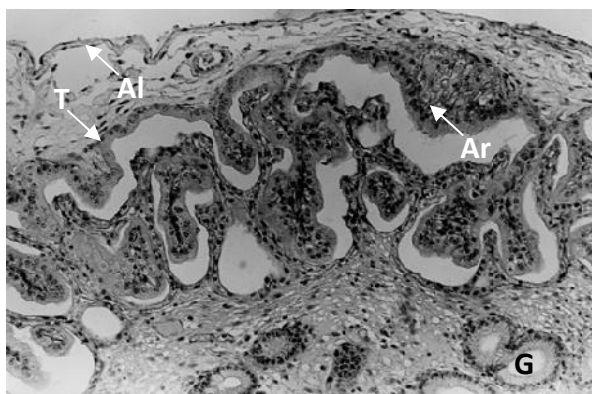
- le trophoblaste invasif envahit l'endomètre et produit les cupules endométriales qui persistent 100 à 120 jpo et sécrètent l'eCG (*equine chorionic gonadotropin*) aux activités FSH-like (*follicle stimulating hormone*) et LH-like (*luteinizing hormone*) (§1.1.1.4.1) (Stewart et al, 1976; Allen, 1982; Saint-Dizier et al, 2003; Saint-Dizier et al, 2004a; Saint-Dizier et al, 2004b)
- et le trophoblaste non-invasif de l'allantochorion forme d'étroites interdigitations avec l'épithélium endométrial à partir de 40 jpo et constitue le placenta définitif responsable des échanges fœto-maternels jusqu'à la parturition.



**Figure 3.** Schéma et photographie du conceptus équin et de ses membranes à 36 jours post-ovulation illustrant la formation de la ceinture chorionique à partir du mésoderme non-vascularisé à la jonction du sac allantoïque en développement et du sac vitellin en régression (Ginther, 1998).



**Figure 4.** Cupules endométriales dans la corne gravide de la jument : (a) cupules à 46 jours post-ovulation et (b) cupules dégénérantes à 97 jours post-ovulation (d'après Allen et Stewart, 2001).



**Figure 5.** Coupe transversale de l'interface allanto-chorion-endomètre chez une jument gravide à 60 jours post-ovulation. Un groupe de trophoblastes pseudo-stratifiés spécialisés dans l'absorption de « lait utérin » est observable dans le coin en haut à droite. T : trophoblaste, Al : allantoïde, Ar : aréole, G : glande endométriale. Grossissement x100 (d'après Allen et Stewart, 2001).

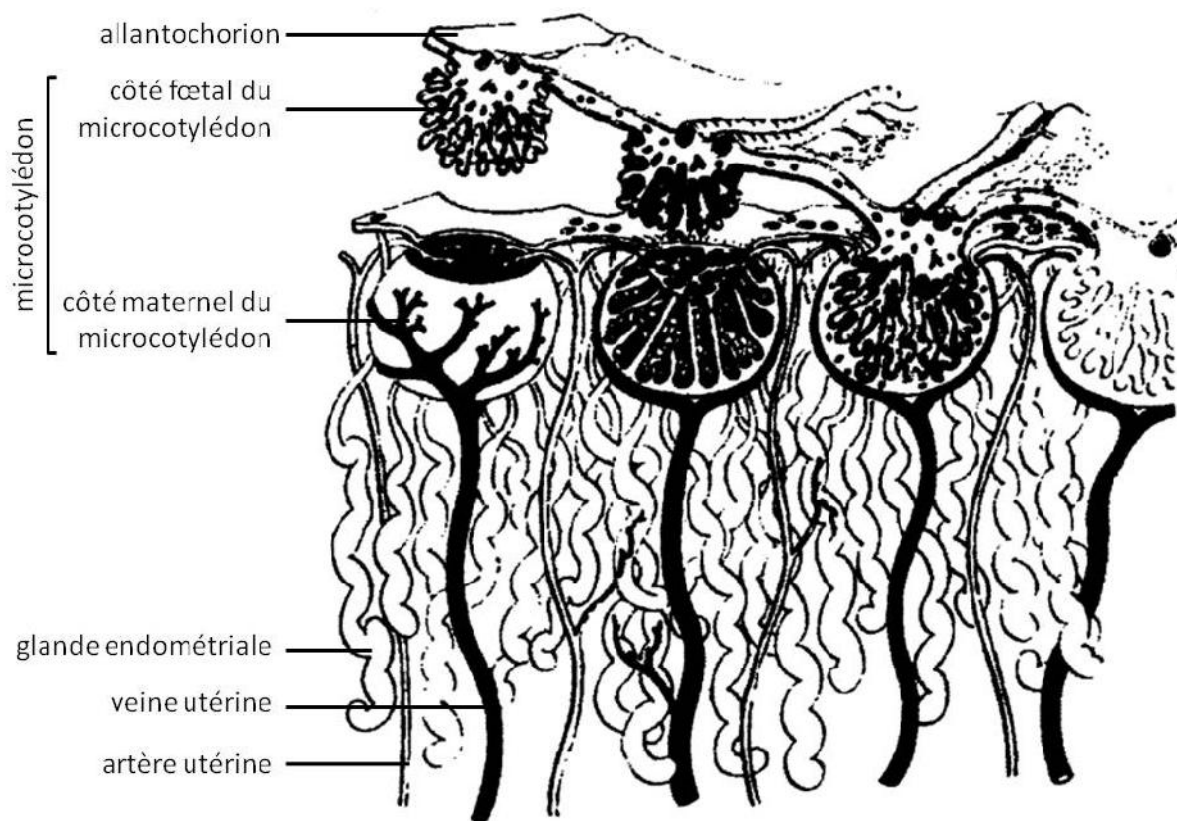
### **1.1.1.3.1. Trophoblaste invasif et cupules endométriales**

Le trophoblaste invasif dans la zone d'apposition de l'allantoïde (en développement) et du sac vitellin (en régression) se différencie de 25 à 35 jpo, se plisse et forme une ceinture cellulaire d'1 cm d'épaisseur autour du conceptus (**Figure 3**) (Allen et Moor, 1972). Les cellules s'hyperplasient et émettent des pseudopodes qui permettent l'adhérence avec l'épithélium endométrial. Vers 35-37 jpo, la ceinture chorionique se sépare du trophoblaste sous-jacent et ses cellules passent entre ou phagocytent les cellules de l'épithélium endométrial puis migrent dans le tissu maternel le long des glandes utérines jusqu'à 40-42 jpo (Allen et al, 1973). Ces cellules devenues binucléées forment alors les cupules endométriales d'origine foetale et maternelle (Wooding et al, 2001). Les cupules apparaissent comme de petites démarcations grises avec une surface concave à la surface de l'endomètre, organisées en fer à cheval ou en cercle à la base de la corne gravide (**Figure 4**) (Clegg et al, 1954). Elles atteignent leur taille et activité endocrine maximales à 70 jpo, puis dégénèrent à partir de 80 jpo et disparaissent entre 100 et 120 jpo (Antczak et Allen, 1989). Cette dégénérescence pourrait être liée à la vascularisation réduite des cupules entraînant la nécrose cellulaire (Enders et al, 1995).

Les cupules endométriales jouent un rôle dans la tolérance immunologique au cours de la gestation (Mathias et al, 1995). Les cellules de la ceinture chorionique expriment à leur surface une grande quantité d'antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I d'origine paternelle, avant et quelques jours après l'invasion de l'endomètre (Crump et al, 1987; Donaldson et al, 1990; Donaldson et al, 1992; Donaldson et al, 1994). Ils induisent une forte réaction humorale maternelle : le jument produit des anticorps spécifiques à chaque étalon, en grande quantité, de 10 à 14 jours après le début de l'invasion, suivi d'une accumulation locale de lymphocytes, rejoints par des macrophages et des éosinophiles à partir de 60-70 jpo. Les leucocytes forment une barrière séparant les tissus foetaux et maternels et, après 70 jpo, ils envahissent les cupules dégénérescentes dont ils accélèrent la nécrose (Grunig et al, 1995; de Mestre et al, 2010). Les sécrétions des glandes utérines forment avec les cellules des cupules nécrosées un coagulum contenant de fortes concentrations d'eCG. *Pour revue (Chavatte, 1995; Ginther, 1998; Allen et Stewart, 2001; Bernardeau et al, 2008; Allen et Wilsher, 2009; Katila, 2011; Meira et al, 2012).*

### **1.1.1.3.2. Trophoblaste non-invasif et placentation**

Le trophoblaste non-invasif établit un contact stable et serré avec l'épithélium endométrial à partir de 40 jpo. C'est l'implantation. Les villosités de l'allantochorion s'emboîtent dans les cryptes de l'endomètre jusqu'à 60 jpo (**Figure 5**) (Silver et al, 1973; Samuel et al, 1974; Steven et Samuel, 1975; Allen et al, 2004). Puis ces villosités allantochorioniques et endométriales se ramifient intensément, deviennent plus longues et plus profondes jusqu'à 120 jpo, formant les microcotylédons. Deux facteurs de croissance seraient à l'origine de l'initiation de la placentation non-invasive à 40 jpo : l'EGF (*epidermal growth factor*), sécrété par les glandes utérines et l'IGF-II (*insulin-like growth factor-II*),



**Figure 6.** Schéma de la structure et de la vascularisation des microcotylédons et des aréoles dans le placenta équin (d'après Steven et Samuel, 1975).

sécrété par les tissus fœtaux, en particulier le trophoblaste (Lennard et al, 1995; Lennard et al, 1998).

Les microcotylédons sont les unités primaires d'échanges hémotrophiques du placenta (**Figure 6**) (Samuel et al, 1975). Ils optimisent la surface microscopique de contact entre les épithéliums fœtal et maternel pour les échanges de nutriments, de gaz et de déchets (Macdonald et al, 2000). Chaque microcotylédon est irrigué par une artère maternelle et drainé par une veine placentaire, formant un système d'échange à contre-courant (Samuel et al, 1975; Steven et Samuel, 1975). Les nutriments doivent traverser six couches tissulaires et les échanges gazeux se font par différence de pression (Silver et Comline, 1975). Les molécules de grande taille comme les anticorps, antigènes et la plupart des bactéries et parasites ne peuvent pas traverser cette barrière placentaire, même si les virus et certaines toxines bactériennes suffisamment petites en sont capables. D'autre part, les glandes utérines restent fonctionnelles tout au long de la gestation et sécrètent le « lait utérin ». Dans les espaces aréolaires qui se développent entre 40 et 80 jpo, des trophoblastes pseudo-stratifiés spécialisés dans l'absorption de l'exsudat exocrine constituent une forme de nutrition histotrophe du fœtus (**Figure 5 et 6**) (Samuel et al, 1977).

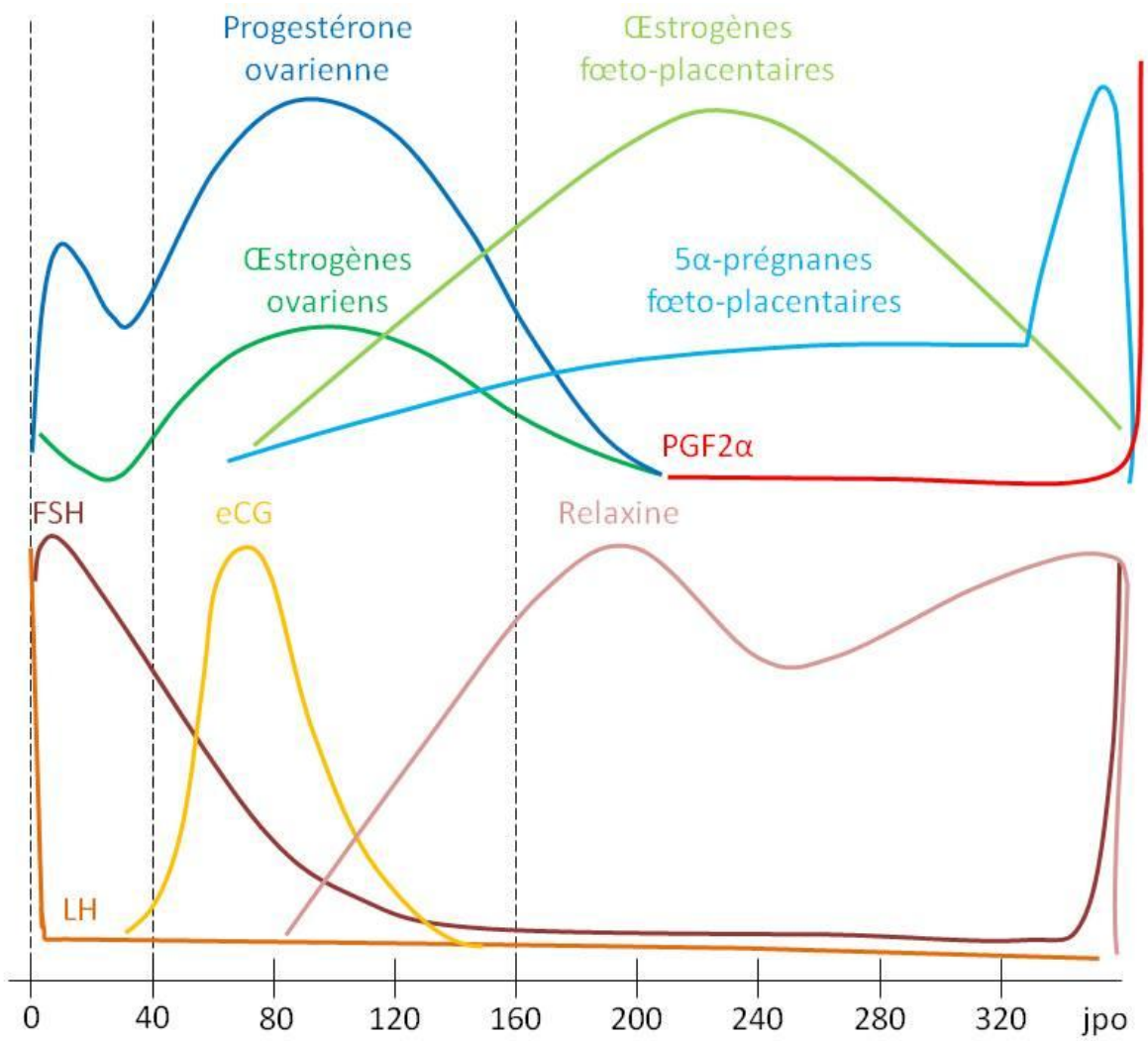
Le placenta est qualifié de diffus car il est en contact avec l'endomètre sur toute sa surface et d'épithéliochorial car l'allantochorion est simplement en contact avec l'épithélium endométrial. Les microcotylédons sont répartis sur toute la surface de l'allantochorion hormis sur une petite surface appelée étoile cervicale. *Pour revue (Chavatte, 1995; Allen et Stewart, 2001; Allen et Wilsher, 2009).*

#### **1.1.1.4. Endocrinologie de la gestation et de la parturition**

##### **1.1.1.4.1. Maintien de la gestation**

Les 14 premiers jours de la gestation ressemblent à la phase lutéale d'une jument cyclique, caractérisée par la sécrétion de progestérone par le corps jaune. En l'absence de gestation, l'endomètre produit vers 14-15 jpo une décharge de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (prostaglandine  $\text{F}_{2\alpha}$ ) qui provoque la lutéolyse et permet un nouvel œstrus (Ganjam et al, 1975). En cas de gestation, la vésicule embryonnaire sécrète les  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et  $\text{PGE}_2$  (prostaglandine  $\text{E}_2$ ). La  $\text{PGE}_2$  initie le transport de l'ovocyte dans l'oviducte en induisant le relâchement des muscles de l'isthme (Weber et al, 1991). Les  $\text{PGE}_2$  et  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimulent les contractions péristaltiques du myomètre et lui permettent de rester mobile dans l'ensemble de l'utérus jusqu'à 16-17 jpo (Gastal et al, 1998; Stout et Allen, 2001, 2002). La mobilité de la vésicule embryonnaire inhibe la décharge endométriale de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , assurant ainsi la reconnaissance maternelle de la gestation et le maintien du corps jaune (Hershman et Douglas, 1979; Leith et Ginther, 1984). La nature de ce signal chez la jument est encore mystérieuse. Cependant, comme le conceptus porcin, le conceptus équin sécrète des œstrogènes dès 12 jpo et il est suggéré que cette sécrétion constituerait le signal de reconnaissance de la gestation (Flood et al,





**Figure 7.** Profils hormonaux de la gestation chez la jument (d'après Ginther, 1992 dans Blanchard et al, 2005 et d'après Fowden et al, 2008b).

1979; Zavy et al, 1979; Heap et al, 1982). De plus, la concentration en récepteurs de l'ocytocine dans l'endomètre est fortement diminuée entre 10 et 16 jpo, empêchant son action lutéolytique *via*  $PGF_{2\alpha}$ . (Goff et al, 1987; Starbuck et al, 1998). Enfin, à 15 jpo, la présence du conceptus bloque l'expression de COX-2 (cyclo-oxygénase 2), responsable de la catalyse des acides arachidoniques libres qui sont ensuite oxydés en prostaglandines à l'action lutéolytique (Boerboom et al, 2004; Rivera Del Alamo et al, 2008).

Imprégné par la progestérone du corps jaune primaire et par les œstrogènes sécrétés dès 12 jpo par la vésicule embryonnaire, l'utérus devient tonique et le conceptus se fixe à 16 jpo sans toutefois s'implanter (Terqui et Palmer, 1979). L'implantation commence dès 40 jpo (§1.1.1.3.2). La sécrétion d'eCG par les cupules endométriales à partir de 35-42 jpo augmente rapidement jusqu'à son niveau maximal entre 55 et 65 jpo, puis elle diminue lentement jusqu'à 100-150 jpo (**Figure 7**). L'eCG est nécessaire au maintien du corps jaune primaire de 35 à 120 jpo (Holtan et al, 1979). La sécrétion de progestérone par le corps jaune primaire augmente de 35 à 40 jpo jusqu'à ce que la sécrétion par les corps jaunes secondaires (ovulations entre 40 et 70 jpo) et accessoires (lutéinisation de follicules anovulatoires entre 40 et 150 jpo) - mis en place grâce au contrôle de la FSH hypophysaire et de l'eCG des cupules endométriales - devient significative (Daels et al, 1998; Saint-Dizier et al, 2003; Saint-Dizier et al, 2004a; Saint-Dizier et al, 2004b). L'ensemble des corps jaunes maintient une concentration sanguine maternelle en progestérone élevée (>10 ng/ml) et assure le maintien de la gestation au cours des 5 premiers mois en réduisant le nombre de jonctions serrées (*gap junctions*) et de récepteurs des hormones utérotoniques comme la  $PGF_{2\alpha}$  et l'ocytocine dans le myomètre (Pashen, 1984; Silver, 1994). Tous les corps jaunes dégénèrent vers 150-200 jpo : la concentration sanguine maternelle en progestérone diminue à moins de 1 ng/ml (**Figure 7**) (Holtan et al, 1991). L'unité fœto-placentaire assure alors seule la sécrétion progestative et le maintien de la gestation jusqu'à la parturition (Squires et Ginther, 1975). En effet, elle synthétise et sécrète de grandes quantités de progestagènes (surtout les 5 $\alpha$ -prégnanes, métabolites de la prégnélonone issue de la circulation fœtale) au milieu et à la fin de la gestation (Holtan et al, 1979; Moss et al, 1979; Hamon et al, 1991; Thorburn, 1993; Silver, 1994; Chavatte et al, 1997). Ces progestagènes sont détectables chez la jument entre 30 et 60 jpo et leur sécrétion augmente progressivement jusqu'à 300 jpo, avec un pic (>200 ng/ml) 2-3 jours avant la parturition (**Figure 7**) (Holtan et al, 1979). Parmi ces progestagènes, la 5 $\alpha$ -dihydroprogestérone a une forte affinité pour le récepteur à la progestérone et serait responsable de la quiescence utérine (Hamon et al, 1991). *Pour revue (Ginther, 1992b; Allen et Stewart, 2001; Blanchard et al, 2005; Fowden et al, 2008; Allen et Wilsher, 2009).*

#### **1.1.1.4.2 Déclenchement de la parturition**

La parturition se déroule en trois stades. Au stade I, les contractions utérines permettent la rotation du fœtus et la rupture de l'allantochorion au niveau du col (Jeffcott et Rossdale, 1979). Au stade II, le poulain est expulsé et le cordon ombilical se rompt. Au stade



III, les membranes fœtales sont expulsées (dans un délai de 30 minutes à 3 heures) : les contractions du myomètre, des extrémités des cornes utérines vers le col et l'invagination du sac allantochorionique entraînent un détachement progressif des microcotylédons. Le déclenchement de la parturition est une interaction complexe entre la jument et l'unité fœto-placentaire (Rossdale et Silver, 1982; Silver, 1990; Ginther, 1998).

L'unité fœto-placentaire sécrète des progestagènes (Holtan et al, 1979; Moss et al, 1979; Hamon et al, 1991; Thorburn, 1993; Silver, 1994; Chavatte et al, 1997) et synthétise des œstrogènes (œstrone, œstradiol, équiline et équilénine) par aromatisation des androgènes produits par les gonades fœtales (Bhavnani et al, 1969, 1971; Bhavnani et Short, 1973; Tait et al, 1983; Mostl, 1994). Dans les 30 derniers jours de gestation, la concentration sanguine maternelle en progestagènes augmente rapidement avec un pic 2-3 jours avant la parturition (**Figure 7**) (Holtan et al, 1975; Moss et al, 1979; Pashen et Allen, 1979; Haluska et Currie, 1988; Hamon et al, 1991; Holtan et al, 1991). Elle commence à diminuer 24 heures avant la parturition et, à la naissance, ne représente plus que 10 à 25% de la concentration maximale (**Figure 7**). La concentration sanguine maternelle en œstrogènes diminue progressivement à partir de 200 jpo, puis brutalement après la parturition (**Figure 7**) (Cox, 1975; Pashen, 1984). L'augmentation du rapport œstrogènes/progestagènes stimule l'évolution du travail *via* la formation de jonctions gap dans le myomètre. Pendant la seconde moitié de la gestation, l'unité fœto-placentaire sécrète aussi la PGE<sub>2</sub> qui induit le relâchement du col utérin et la PGF<sub>2α</sub> qui stimule les contractions utérines en augmentant la concentration intracellulaire en calcium des myocytes (Silver et al, 1979; Leadon et al, 1982; Rigby et al, 1998). La concentration sanguine maternelle en PGF<sub>2α</sub> augmente progressivement à l'approche du terme et jusqu'à 20-50 fois en cours de travail (**Figure 7**). Les pics de « relargage » de PGF<sub>2α</sub> dans les jours suivant la parturition sont attribués à l'involution utérine. Enfin, le placenta sécrète la relaxine dès 80 jpo. La concentration sanguine maternelle en relaxine augmente jusqu'à des valeurs maximales au cours du stade II et diminue après le stade III (**Figure 7**). Dans les autres espèces, la relaxine a un effet relaxant sur les ligaments pelviens et sur le col. En synergie avec la 5α-dihydroprogestérone, elle inhiberait les contractions spontanées du myomètre (McKinnon et al, 1992; Chavatte-Palmer et al, 2000b).

Le lobe postérieur de l'hypophyse maternelle sécrète de l'ocytocine dont la concentration augmente juste avant que l'allantochorion soit visible aux lèvres de la vulve (Haluska et Currie, 1988; Vivrette et al, 2000). L'ocytocine serait l'initiateur du stade II. En synergie avec la PGF<sub>2α</sub>, elle stimule l'activité contractile du myomètre et la sécrétion de relaxine par le placenta au début du stade II.

#### **1.1.1.4.3. Adaptations physiologiques liées à la parturition**

Le métabolisme maternel des glucides et en particulier la fonction des cellules β pancréatiques s'ajustent après 270 jpo, avec une diminution de l'insulinémie et de

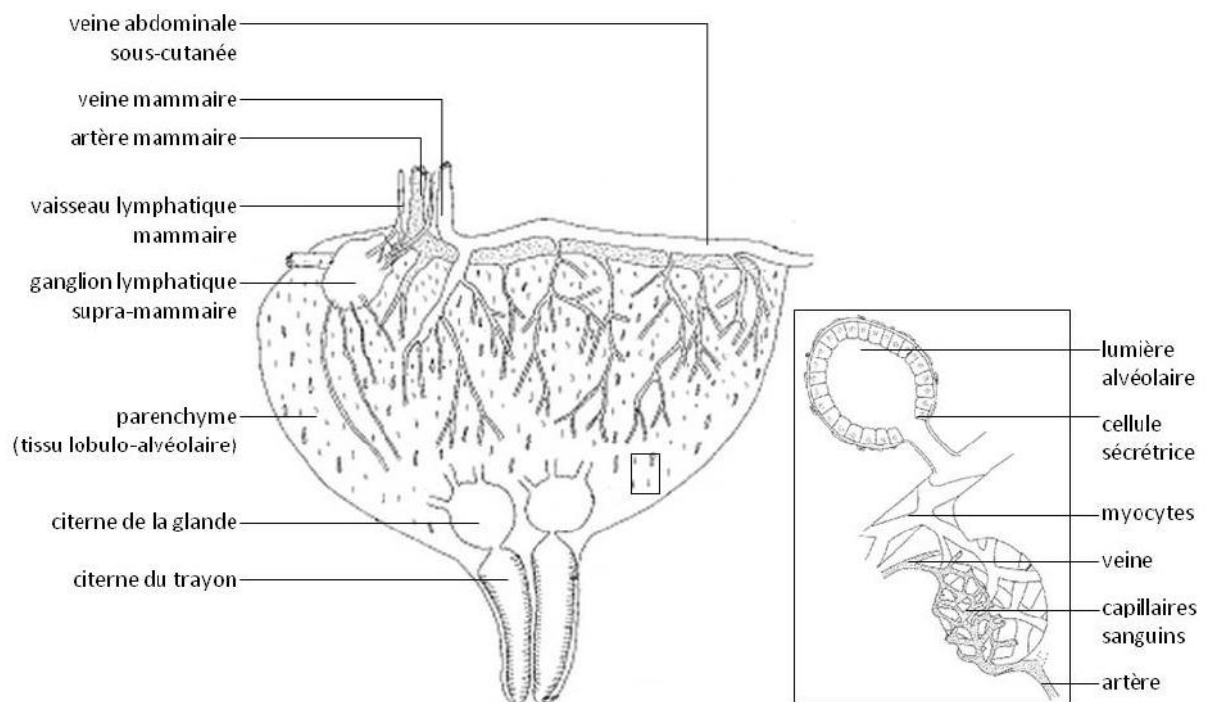


l'efficacité de l'insuline, une tendance à la diminution de la glycémie et une hypoglycémie à jeun (corrélée à la sécrétion augmentée de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) (Fowden et al, 1984). Ces changements permettent une disponibilité accrue de glucose pour le fœtus. L'insuline est aussi détectée dans le sang fœtal en fin de gestation (Barnes et al, 1979; Fowden et al, 1980; Fowden et al, 1984).

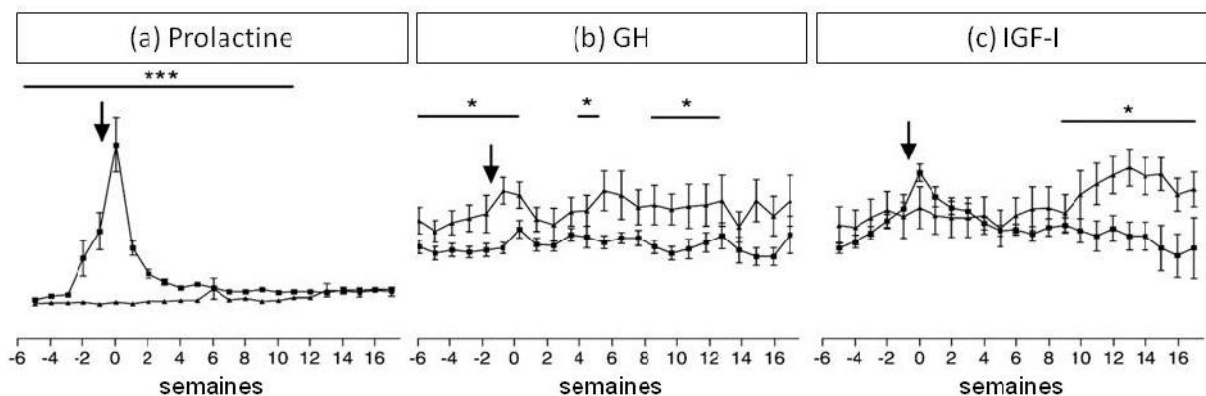
Enfin, la survie du nouveau-né est liée à la maturité de ses glandes surrénales dont le poids augmente pendant les 20 à 30 derniers jours de gestation, passant de 60 mg/kg à 300 jpo à 100 mg/kg à terme (Silver, 1990). La concentration sanguine fœtale en cortisol reste basse jusqu'à 4-5 jours avant la parturition et augmente exponentiellement dans les dernières 24-36 heures avant la naissance (Silver, 1990, 1994; Fowden et al, 1998). Le cortisol est essentiel à la préparation du fœtus pour la vie extra-utérine car il intervient dans la maturation pulmonaire, la production de surfactant alvéolaire, la maturation fonctionnelle des intestins et l'activation de systèmes enzymatiques tels que la conversion des progestagènes placentaires en œstrogènes (Nathanielsz et al, 1972; Rosedale et al, 1973; Fowden et al, 1985; Han et al, 1995). Le passage d'une dominance progestagénique à une dominance œstrogénique déclenche la sécrétion utérine de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (**Figure 7**) et la première phase du travail expulsif (Haluska et Currie, 1988; Silver, 1990). Associées au relâchement du col, les contractions du myomètre permettent l'avancée du fœtus dans le vagin : la dilatation cervicale et vaginale induit à son tour la libération d'ocytocine (réflexe de Ferguson).

#### 1.1.1.5. Effets des apports alimentaires sur la fertilité

Peu d'études font référence aux effets des apports alimentaires sur la jument gravide *per se*. Le plus souvent, l'objet des travaux faisant varier la qualité et/ou les niveaux des apports alimentaires de la jument gravide est d'en observer les effets chez les poulains. Ces travaux seront rapportés plus loin (§1.3.3.3.3). Néanmoins, les juments présentant un état corporel élevé sont plus fertiles. En effet, Henneke et ses collègues ont fait maigrir des juments pendant le dernier trimestre de gestation et ont maintenu leur état corporel bas pendant le premier trimestre de lactation. Après trois cycles, le taux de gestation de ces juments était diminué de 50% à 30 jpo et de 75% à 90 jpo par rapport aux juments grasses (note d'état corporel supérieure à 5 sur une échelle de 1 à 9) pendant le dernier trimestre de gestation ou aux juments maigrissant pendant le dernier trimestre de gestation mais redevenant grasses pendant le premier trimestre de lactation (Henneke et al, 1984). Ces résultats ont été confirmés chez les juments de race Lusitanien puisque celles gagnant en état corporel au moment de la conception étaient plus fertiles au cours de deux premiers cycles *postpartum* (Fradinho et al, 2014). La fréquence de distribution des fourrages semble aussi être déterminante puisque le taux de gestation des juments Arabes est de 81 % lorsqu'ils sont disponibles en continu (jour et nuit) et de seulement 55% lorsqu'ils ne sont disponibles que la nuit (Benhajali et al, 2013).



**Figure 8.** Coupes transversales schématiques de la glande mammaire (à gauche) et d'une alvéole mammaire (à droite) chez la jument (d'après Davies Morel, 2008).



**Figure 9.** Concentrations sanguines maternelles en prolactine, GH et IGF-I chez la jument de race Lipizzan gravide puis allaitante (carré noir) et chez la jument non-allaitante (triangle noir). Les astérisques indiquent les différences significatives entre ces deux lots ( $p < 0,05$ ) (d'après Heidler et al, 2003).

## 1.1.2. Physiologie normale de la jument allaitante

### 1.1.2.1. Lactogenèse, galactopoïèse et éjection du lait

La mamelle de la jument est composée de quatre glandes et de deux trayons, chacun desservi par deux citernes. Le lait est sécrété par des cellules épithéliales spécialisées organisées en alvéoles qui s'ouvrent sur de petits canaux. Les alvéoles sont groupés en lobules formant le tissu sécrétoire. Elles sont entourées de cellules myoépithéliales responsables de l'éjection du lait. Les petits canaux rejoignent de grands canaux qui convergent vers les citernes (**Figure 8**). La mamelle évolue en trois phases sous contrôle hormonal voire neuroendocrine : croissance pendant la gestation, sécrétion pendant la lactation et involution après le sevrage. La lactation consiste en trois phases successives : lactogenèse, galactopoïèse et éjection du lait.

La lactogenèse correspond à la sécrétion initiale de lait. Elle résulte en la production de colostrum dans les glandes mammaires juste avant la parturition. La concentration en progestagènes, d'abord élevée (§1.1.1.4.2), induit le développement du tissu sécrétoire aux dépens du tissu adipeux, tout en inhibant la sécrétion de lait. Puis la diminution de la concentration en progestagènes 24 heures avant la parturition (§1.1.1.4.2) lève cette inhibition (Mepham, 1987; Chavatte-Palmer et al, 2000a; Chavatte-Palmer et al, 2000b). La lactogenèse est aussi sous le contrôle de la prolactine, sécrétée par l'hypophyse antérieure et dont la concentration augmente à l'approche de la parturition avec un pic dans la première semaine de lactation (Worthy et al, 1986; Neuschaefer et al, 1991; Aurich et al, 2001; Heidler et al, 2003). Cette sécrétion accrue de prolactine est associée à une diminution de la concentration en GH (*growth hormone*) pendant les 5 dernières semaines de gestation et pendant la lactation, ainsi qu'à une augmentation progressive de la concentration en IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) avec un pic à la parturition (**Figure 9**) (Heidler et al, 2003). Le terme galactopoïèse désigne le maintien de la sécrétion de lait, sous le contrôle de la prolactine dont la concentration reste élevée pendant les deux à 3 premiers mois de lactation (**Figure 9**) (Nett et al, 1975; Neuschaefer et al, 1991; Aurich et al, 2001; Heidler et al, 2003; Elefteriou et al, 2005).

L'éjection du lait est sous contrôle neuroendocrine. La tétée du poulain stimule mécaniquement les terminaisons nerveuses dans les trayons. A l'échelle locale, l'activation de cette voie nerveuse cause la contraction des cellules myoépithéliales. Elle stimule aussi le noyau paraventriculaire de l'hypophyse maternelle. Ce dernier active la sécrétion d'ocytocine par l'hypophyse postérieure (Sharma, 1974). A l'échelle de la glande mammaire, l'ocytocine stimule la contraction des cellules myoépithéliales, expulsant le lait hors des alvéoles dans les canaux et jusque dans les citernes. Ainsi, à chaque pression, le poulain obtient le lait de la citerne et induit un réflexe d'éjection qui remplit la citerne *de novo* (Ellendorff et Schams, 1988; Davies Morel, 2008). Lorsque la demande du poulain diminue à





partir du 3<sup>ème</sup> mois de lactation, l'accumulation de lait augmente la pression alvéolaire (Ellendorff et Schams, 1988). La mamelle s'engage alors dans un processus d'involution : le tissu mammaire est remplacé par du tissu conjonctif et adipeux (Martin-Rosset, 2012). *Pour revue (McKinnon et Voss, 1992; Chavatte, 1997; Davies Morel, 2008).*

### 1.1.2.2. Production laitière

En l'absence d'intervention humaine, la lactation dure 1 an. Quelques cas de poulains sous la mère âgés de 2 à 3 ans sont décrits, mais en France, les chevaux de course sont sevrés vers 5-6 mois et les chevaux de selle ou destinés à la production de viande sont sevrés vers 7-8 mois (Doreau et Boulot, 1989b). Pendant la première semaine de lactation, le poulain tète jusqu'à quatre fois/heure. A 10 semaines de lactation, il ne tète plus qu'une fois/heure. Si la fréquence diminue, la quantité ingérée à chaque tétée augmente.

Quelques données sur la production laitière des juments allaitantes sont disponibles. Les rendements cités ici, mesurés sur l'ensemble de la lactation, sont des moyennes. Des rendements de 2 600 kg, de 1 500 à 2 300 kg et de 1 700 kg sont rapportés respectivement pour la jument de trait, la jument de selle et la ponette (von Neseni et al, 1958; Bouwman et van der Schee, 1978; Gibbs et al, 1982). La production laitière journalière varie beaucoup selon les études, mais elle est généralement comprise entre 10 et 30 kg/jour (Doreau et Boulot, 1989b). Lorsqu'elle est rapportée au poids vif de la jument, la production laitière est de 2 à 3,5 kg/100 kg de poids vif chez les juments de trait et de selle (Doreau et al, 1986; Doreau et Boulot, 1989b). Elle serait plus importante chez les ponettes avec 5 kg/100 kg de poids vif (von Neseni et al, 1958). Cela correspond à une production de 14 à 24,5 kg/jour pour une jument de trait de 700 kg, de 10 à 17,5 kg/jour pour une jument de selle de 500 kg et de 15 kg/jour pour une ponette de 300 kg (Martin-Rosset, 2012).

La production laitière reflète la demande, donc la taille du poulain. Ainsi, la sécrétion de lait continue d'augmenter tant que le poulain grandit jusqu'à 2-3 mois de lactation où elle est maximale. Elle atteint alors 10 à 18 kg/jour pour une jument Pur-Sang et 12 kg/jour pour une ponette (von Neseni et al, 1958; Bouwman et van der Schee, 1978; Doreau et al, 1982; Gibbs et al, 1982; Oftedal et al, 1983; Doreau et al, 1986; Doreau et al, 1990). La demande du poulain diminue après 3 mois de lactation, âge à partir duquel l'alimentation lactée est complétée de manière significative par le pâturage, les concentrés et/ou le foin. *Pour revue (Davies Morel, 2008; Martin-Rosset, 2012).*

Plusieurs études soulignent une augmentation du potentiel de lactation jusqu'à l'âge de 11 à 15 ans et la production laitière augmenterait entre la première et la seconde lactation, ainsi qu'entre la seconde et la troisième lactation (Doreau et Boulot, 1989b, a). Puis le potentiel de lactation diminuerait à cause de changements morphologiques de la mamelle, ainsi que le nombre et l'activité des cellules sécrétrices.

Eau (%)	89
Matière grasse (g/kg)	6-20
Energie (kcal/kg)	460-600
Protéines (g/kg)	19-40
Lactose (g/kg)	51-69
Matière sèche (g/kg)	0,6-3
Ca (mg/kg)	600-1200
P (mg/kg)	230-800
Mg (mg/kg)	30-100
Potassium (mg/kg)	400-700
Sodium (mg/kg)	160-246
Cuivre (mg/kg)	200-450
Zinc (mg/kg)	1800-2500

Tableau 1. Composition moyenne du lait au cours de la lactation de la jument (d'après Davies Morel, 2008).

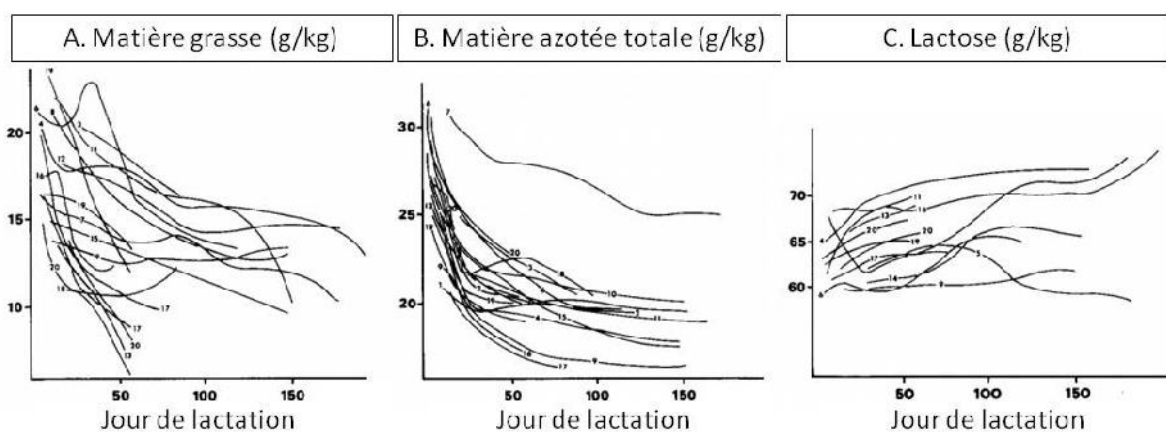


Figure 10. Variations de la composition du lait de jument en cours de lactation. A. Matière grasse, B. Matière azotée totale, C. Lactose (d'après une métanalyse de Doreau et Boulot, 1989).

### 1.1.2.3. Composition du colostrum et du lait

#### 1.1.2.3.1. Colostrum

Le colostrum, produit en fin de gestation, est la première sécrétion lactée ingérée par le poulain. Il est sécrété environ pendant les premières 24 heures et est progressivement remplacé par le lait. Le colostrum contient des cellules (lymphocytes, macrophages et neutrophiles) et des substances solubles (enzymes, hormones, facteurs de croissance, cytokines et surtout immunoglobulines Ig). La prise colostrale débute 1 à 3 heures *postpartum* et les Ig maternelles sont détectés dans le sang du poulain dès 6 heures *postpartum*. La demi-vie des Ig maternelles est de 20-30 jours dans le sang du poulain. Ces macromolécules sont absorbées par des entérocytes spécialisés de l'intestin grêle *via* un mécanisme de pinocytose. Leur absorption est maximale immédiatement après la naissance, décroît rapidement jusqu'à moins de 1% à 20 heures et cesse vers 24 heures *postpartum*. Ce phénomène est lié au turnover rapide de ces entérocytes spécialisés. Il serait induit par la concentration importante en cortisol pendant les 24 premières heures *postpartum* (Jeffcott, 1971; Nathanielsz et al, 1972; Jeffcott, 1974b, a; LeBlanc, 2001).

Ainsi, le colostrum est particulièrement riche en matière azotée totale (13,5%), constituée jusqu'à 80% d'Ig, principalement des IgG, mais aussi des IgA et des IgM (von Neseni et al, 1958; Rouse et Ingram, 1970; Pearson et al, 1984; Kohn et al, 1989; Lavoie et al, 1989; McKinnon et Voss, 1992). Dans les 24-96 premières heures *postpartum*, la teneur en matière azotée totale diminue progressivement tandis que la teneur en matière grasse augmente (Ullrey et al, 1966). *Pour revue (McKinnon et Voss, 1992; Davies Morel, 2008).*

#### 1.1.2.3.2. Matière grasse et énergie du lait

La teneur en matière grasse (MG) du lait de jument varie de 0 à 7,9% (**Tableau 1**) (von Neseni et al, 1958; Neuhaus, 1959; Doreau et Boulot, 1989b). La MG du lait est organisée en globules de 2-3 µm. Elle est riche en acides gras libres (79% de la MG) et en phospholipides (5 à 19% de la MG) (Doreau et Boulot, 1989b). Le lait de jument est particulièrement riche en acides linoléique et linolénique du fait de l'absence d'hydrogénation des acides gras dans le tractus digestif maternel avant absorption. De plus, les chevaux consomment principalement des fourrages et des concentrés, respectivement riches en chacun de ces acides gras. La mamelle synthétise aussi des acides gras *de novo*. Cette pauvreté en MG fait du lait de jument un lait pauvre en énergie brute avec 500 à 600 kcal/kg (**Tableau 1**) (Doreau et al, 1988c). La teneur en MG diminue plus ou moins vite selon les études, de 15-25 g/kg à 5-15 g/kg du début à la fin de la lactation (**Figure 10**) (Smolders et al, 1990). *Pour revue (Doreau et Boulot, 1989b; Martin-Rosset, 2012).*

#### 1.1.2.3.3. Matière azotée totale du lait

La teneur en matière azotée totale (MAT) du lait de jument varie de 1,7 à 3,0% (**Tableau 1**) (von Neseni et al, 1958). La MAT provient de la dégradation de l'azote dans le



gros intestin et se compose principalement d'azote non-protéique (environ 10% de la MAT), de caséines (<50%) et de lactosérum. L'azote non-protéique est constitué d'une part importante d'urée (38 à 51%) et d'acides aminés libres, le lait de jument étant riche en sérine et en acide glutamique (Doreau et al, 1988b; Doreau et Boulot, 1989b). Les caséines ont plusieurs fonctions. *Primo*, sous l'effet du pH stomacal acide, elles forment des caséinates de calcium qui facilitent la digestion des protéines. *Secundo*, elles contiennent des acides aminés essentiels. *Tertio*, elles interviennent dans le transfert des minéraux de la jument au poulain puisqu'elles s'associent à des ions calcium, phosphore et magnésium. Après la prise colostrale, le lactosérum est constitué d'immunoglobulines (Ig, 11 à 21%) et surtout de lactalbumines  $\alpha$  (26 à 50%) et de lactoglobulines  $\beta$  (28 à 60%) spécifiques du lait, mais aussi de sérum albumines (2 à 15%) et de sérum globulines (11 à 21%) qui se trouvent aussi dans le sang (Gibbs et al, 1982; Doreau et Boulot, 1989b; Davies Morel, 2008). La teneur en MAT diminue rapidement jusqu'à 2 mois de lactation, de 25-30g/kg à 5-10 g/kg du début à la fin de la lactation (**Figure 10**) (Smolders et al, 1990). Quelques études montrent une diminution de la teneur en protéines quand la jument vieillit, ainsi que lorsque la parité augmente. La teneur en protéines serait plus forte lors de la première lactation que lors de la seconde (Gibbs et al, 1982). *Pour revue (Boulot, 1987; Doreau et Boulot, 1989b; Martin-Rosset, 2012).*

#### **1.1.2.3.4. Glucides du lait**

Les glucides du lait sont presque exclusivement constitués de lactose, avec une teneur de 5,9 à 7,7% (**Tableau 1**) (von Neseni et al, 1958; Doreau et Boulot, 1989b). Le lactose provient du glucose absorbé dans l'intestin grêle (Martin-Rosset, 2012). *A contrario* des teneurs en MG et MAT, la teneur en lactose augmente en cours de lactation et atteint un plateau de 55-65 g/kg à 3 mois de lactation (**Figure 10**) (Smolders et al, 1990). Quelques études montrent une diminution de la teneur en lactose quand la jument vieillit, ainsi que lorsque la parité augmente (Gibbs et al, 1982). *Pour revue (Boulot, 1987; Doreau et Boulot, 1989b; Martin-Rosset, 2012).*

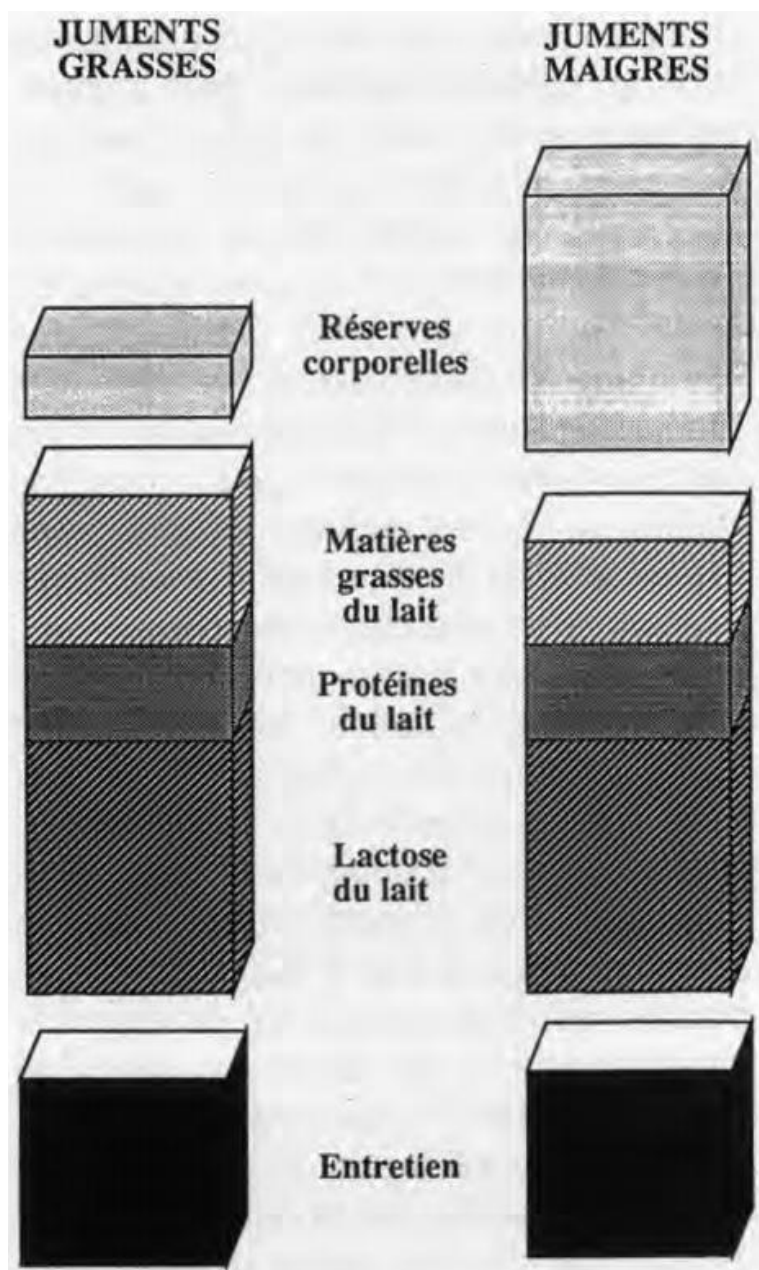
#### **1.1.2.3.5. Matière sèche, minéraux et vitamines du lait**

Le lait de jument est pauvre en matière sèche (Mephram, 1987) et contient seulement 5 g/kg de minéraux (**Tableau 1**), mais sa teneur en vitamine C est importante (Schryver et al, 1986a; Schryver et al, 1986b). *Pour revue (Doreau et Boulot, 1989b; Davies Morel, 2008).*

### **1.1.2.4. Effets des apports alimentaires sur la quantité et la qualité du lait**

#### **1.1.2.4.1. Effets des apports alimentaires sur la production laitière**

Le niveau d'énergie de la ration en début de lactation aurait un effet positif sur la croissance du poulain et sur la production laitière quand l'état corporel de la jument à la parturition est satisfaisant (Sutton et al, 1977; Jordan, 1979; Doreau et al, 1988a). De même la supplémentation avec des concentrés de la jument au pâturage stimulerait la production



**Figure 11.** Utilisation de l'énergie métabolisable ingérée : répartition entre les besoins d'entretien, de lactation et la reconstitution des réserves corporelles (Doreau, 1994).

laitière (Doreau et Boulot, 1989b). D'autre part, une ration limitée en glucose absorbable n'affecterait pas la production laitière (Doreau et al, 1986), malgré les besoins élevés en glucose pour la synthèse de lactose. Ces études sont difficiles à comparer car elles confondent les effets du niveau d'énergie et du niveau d'amidon de la ration, les résultats dépendant de la couverture des besoins et des réserves corporelles de la jument. En effet, chez la jument, la reconstitution des réserves corporelles est prioritaire sur la lactation : chez les juments maigres, près de 30% de l'énergie permet le dépôt des réserves, tandis que chez les juments grasses, une part plus importante de l'énergie est utilisée pour la synthèse des lipides du lait (**Figure 11**) (Doreau, 1994).

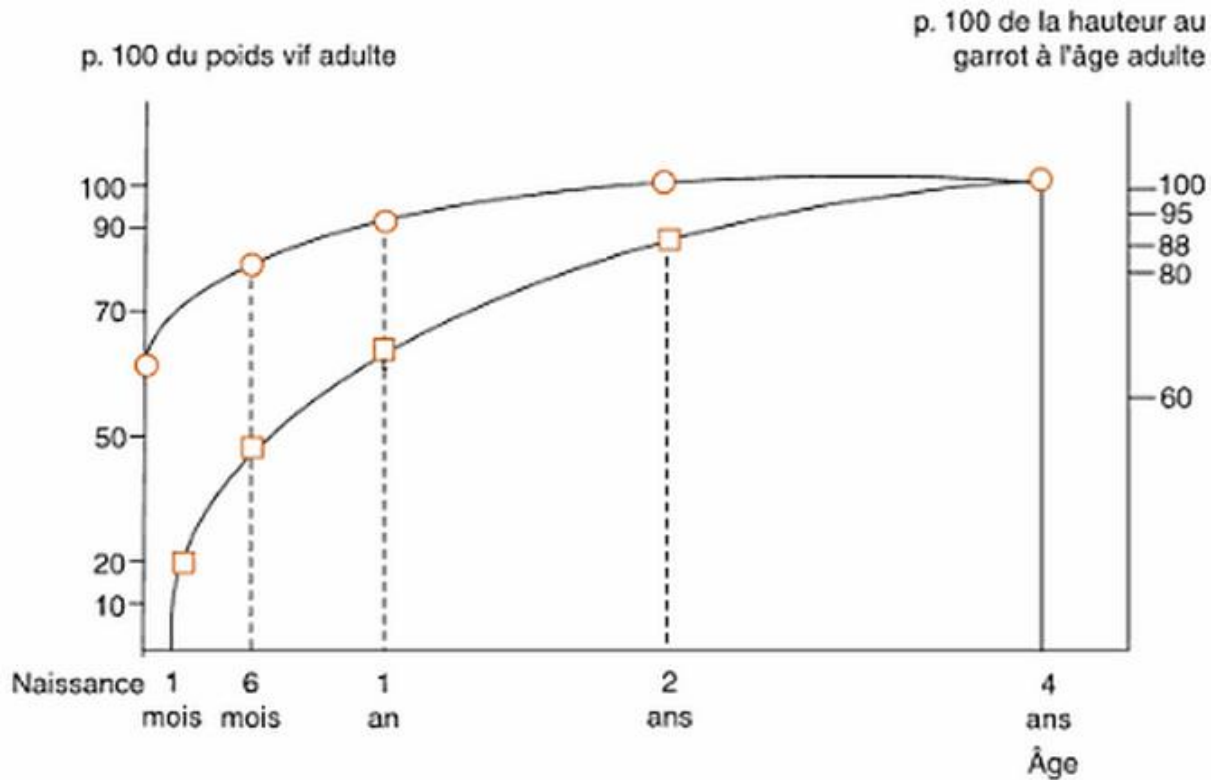
La croissance du poulain est souvent utilisée comme marqueur de la production laitière. Le niveau des apports azotés de la ration aurait aussi un impact sur la production laitière. La restriction de la MAT (11 *versus* 14% de la ration) à niveau d'énergie égal ralentit la croissance du poulain (Gill et al, 1983) et la restriction des matières azotées digestibles (60% *versus* 100% des besoins) à niveau d'énergie égal diminue le gain de poids du poulain (-200g/jour) (Doreau et al, 1988b). Ces restrictions stimuleraient donc la production laitière, ce qui expliquerait la forte réduction de la teneur en MAT du lait (Doreau et al, 1988b).

L'alimentation en fin de gestation affecterait aussi la production laitière *via* le métabolisme de la glande mammaire. Dans certains cas, la restriction des apports énergétiques en fin de gestation (55 à 80% des besoins) est sans effet sur le poids et la santé du poulain à la naissance (Banach et Evans, 1981; Henneke et al, 1981; Boulot, 1987). En revanche, la surnutrition des juments en fin de gestation pourrait augmenter la croissance du poulain en cas de restriction nutritionnelle pendant la lactation (Goater et al, 1981).

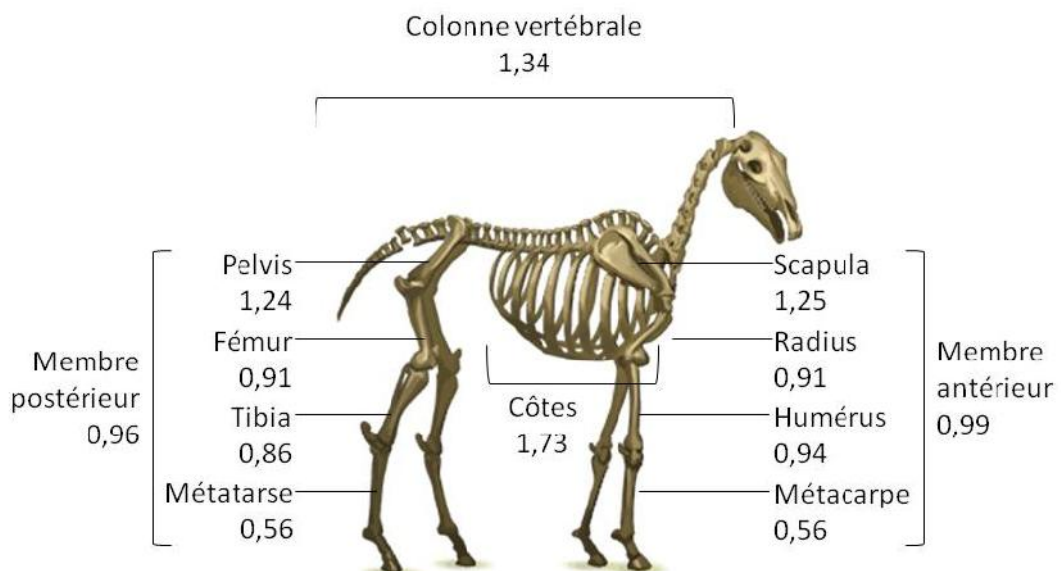
#### **1.1.2.4.2. Effets des apports alimentaires sur la composition du lait**

Une augmentation de l'énergie digestible et de l'azote (environ 85 et 100% des besoins) n'affecte ni la teneur en MG, ni la teneur en lactose, ni la teneur en minéraux, mais diminue la teneur en protéines du lait (Sutton et al, 1977). Une augmentation de l'énergie digestible (80, 100 et 125% des besoins) avec un apport azoté optimal n'affecte pas la teneur en lactose, mais diminue la teneur en MG et protéines (Pagan et Hintz, 1984). Enfin, une augmentation de l'énergie digestible et de l'azote (deux rations supérieures aux besoins différentes par leurs proportions en fourrages et concentrés) augmente la teneur en lactose mais diminue la teneur en protéines et en MG du lait (Doreau et al, 1992). Ainsi, la teneur en protéines diminuerait quand l'apport énergétique de la ration augmente. La teneur en MG diminuerait quand la proportion de concentrés dans la ration augmente, mais aussi quand la part de lipides dans la ration augmente (Davison et al, 1987). En revanche, plus la jument est grasse à la parturition, plus le lait est riche en MG (Doreau et al, 1988a). Ces observations doivent être confirmées. La teneur en lactose du lait varie peu avec l'alimentation. Elle est plus faible avec un régime riche en foin qu'avec un régime riche en concentrés (Doreau et al, 1992), le déficit en glucose absorbé dû à l'absence de céréales dans la ration limitant la





**Figure 12.** Evolution du poids vif (carrés) et de la hauteur au garrot (rond) du cheval de selle en fonction de l'âge (Martin-Rosset, 2012).



**Figure 13.** Croissance relative des différentes régions du squelette par rapport au squelette total de la naissance à 30 mois. Chaque chiffre (x) est un coefficient d'allométrie. Si  $x=1$ , la région se développe au même rythme que le corps entier (poids vif vide). Si  $x<1$ , la région se développe plus vite que le corps entier (poids vif vide) et *vice versa* si  $x>1$ . Le poids vif vide est la différence entre le poids vif et le poids du contenu du tube digestif (d'après Martin-Rosset et al, 1980 et Martin-Rosset, 2005 dans Martin-Rosset, 2012).

synthèse de lactose. Enfin, aucune supplémentation en cuivre, zinc ou fer ne modifie la teneur du lait en ces éléments (Martin-Rosset, 2012).

### 1.1.3. Croissance et développement normaux du poulain

#### 1.1.3.1. Croissance et développement

A la naissance, le poulain pèse de 18 kg chez le poney Shetland à 75 kg chez certaines races de trait. Ce poids de naissance représente 8 à 12% du poids vif de la jument selon les races : plus la race est de petit format, plus ce rapport est élevé. Le poids vif du poulain double au cours du premier mois (Martin-Rosset, 1983). Au sevrage (traditionnellement à 6-8 mois) et à 1 an, le poulain atteint respectivement 45 et 65% de son poids vif adulte et respectivement 80 et 88% de sa hauteur au garrot finale (**Figure 12**). La croissance longitudinale des os étant importante, à 1 an, le poulain s'inscrit dans un rectangle vertical (Green, 1969). Entre 1 et 2 ans, il se développe en longueur et en largeur et atteint 75% de son poids vif adulte, définitivement acquis entre 3 et 5 ans selon les races. Il s'inscrit alors dans un carré. Après 2 ans, la longueur du corps augmente de 60% jusqu'à l'âge adulte vers 3-4 ans pour les races de course et 4-5 ans pour les races de sport-loisir et le cheval s'inscrit dans un rectangle couché (Martin-Rosset, 1983).

Ainsi, entre la naissance et le sevrage, le gain moyen quotidien (GMQ) est de 950 g/jour pour les races de selle et de 1 450 g/jour pour les races de trait et la hauteur au garrot augmente en moyenne de 5 cm/mois pour les races de selle. Entre le sevrage et 1 an, le GMQ varie de 600 g/jour pour les races de selle à 1 600 g/jour pour les races de trait et la croissance en taille n'est plus que de 2 cm/mois pour les races de selle (Olofsson et Thomke, 1963; Martin-Rosset et Jussiaux, 1977). Entre 1 et 2 ans, le GMQ diminue progressivement et le périmètre thoracique et la largeur des épaules augmentent de 65%, ainsi que la longueur du corps dans une moindre mesure. Après 2 ans, la croissance est ralentie de 150 à 300 g/jour jusqu'à l'âge adulte (**Figure 12**).

Le squelette a un développement pondéral plus précoce que les tissus musculaires et adipeux, avec un gradient de croissance relative marqué de l'extrémité des membres (en particulier du canon) vers les ceintures et la colonne vertébrale au développement plus tardif. Les parties intermédiaires des membres ont un développement moyen (**Figure 13**) (Martin-Rosset et al, 1980; Martin-Rosset, 2005). *Pour revue (Martin-Rosset, 2012).*

#### 1.1.3.2. Facteurs de variation de la croissance et du développement

##### 1.1.3.2.1. Race

La génétique de l'individu détermine son format. Son héritabilité est de 0,35 (Langlois, 1973), ce coefficient variant de 0,12 à 0,63 selon le paramètre considéré (hauteur

Race de la jument	Race de l'étalon	Poids de naissance (kg)	Référence
Shetland	Shire	17	Walton et Hammond, 1938
Shire	Shetland	53	
Shetland	Shetland	17	
Shire	Shire	70	
Shetland	Mecklenbourg	27	Flade, 1965
Mecklenbourg	Shetland	48	
Shetland	Shetland	21	
Mecklenbourg	Mecklenbourg	60	

**Tableau 2.** Effet du format de la jument sur le poids vif du poulain à la naissance (d'après Walton et Hammond, 1938 et Flade, 1965 dans Martin-Rosset, 2012).

	Ardennais n=13	Boulonnais n=15	Bretons n =13	Comtois n = 17	Percherons n=15
<b>Coefficient d'allométrie par rapport au poids vif vide</b>					
<b>Carcasse</b>	0,993	1,000	1,000	1,001	1,003
<b>Muscles</b>	0,985 <sup>a</sup>	1,022 <sup>a</sup>	1,006 <sup>ab</sup>	0,970 <sup>acd</sup>	1,019 <sup>b</sup>
<b>Tissu adipeux</b>	1,106 <sup>a</sup>	0,784 <sup>b</sup>	0,998 <sup>ab</sup>	1,320 <sup>ac</sup>	0,864 <sup>ab</sup>
<b>Os</b>	0,968 <sup>a</sup>	1,064 <sup>b</sup>	1,040 <sup>ad</sup>	0,915 <sup>bc</sup>	1,057 <sup>bd</sup>
<b>Composition de la carcasse à un poids de 356 kg (%)</b>					
<b>Muscle</b>	69,2	71,9	70,8	68,2	71,7
<b>Tissu adipeux</b>	11,9	8,6	10,8	14,2	9,3
<b>Os</b>	14,8	16,3	15,3	14,0	16,2

**Tableau 3.** Variation de la croissance relative des tissus chez différentes races de trait entre 12 et 30 mois. Au sein d'une même ligne, les valeurs avec des exposants différents (a, b, c, d) sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) (d'après Martin-Rosset et al, 1983 dans Martin-Rosset, 2012).

au garrot, périmètre thoracique ou encore périmètre du canon). Les chevaux lourds sont plus tardifs que les chevaux légers : le cheval arabe est plus tardif que le Pur-Sang anglais et, de manière générale, les chevaux de sport et loisirs (Selle Français et Anglo-Arabe) sont plus tardifs que les chevaux de course (Pur-Sang et Trotteurs) (Martin-Rosset, 1983; Heugebaert et al, 2009). Cet effet génétique est modulé par le format maternel, responsable de 12% de la variation du poids de naissance (Langlois, 1973), comme démontré par des croisements réciproques entre des races de tailles différentes (§1.3.3.3.1) (**Tableau 2**) (Walton et Hammond, 1938; Flade, 1965).

Le GMQ est corrélé au format adulte de la race. Il est de 0,25, 1 et 1,3 kg/jour entre 6 et 18 mois, respectivement chez les poneys (250 kg adulte), les chevaux de selle (450 kg adulte) et les chevaux de trait (900 kg adulte). Les variations intra-races sont plus limitées (de 15 à 20%) et leur héritabilité n'est pas encore évaluée (Martin-Rosset, 2012).

La carcasse de chevaux de trait de races différentes, engraisés puis abattus au même âge entre 12 et 30 mois, est plus lourde chez les chevaux de très grand format (percherons de 407 kg) que chez les chevaux de plus petit format (Comtois, Ardennais, Boulonnais et Bretons de 339 à 363 kg). De plus, la carcasse des chevaux Comtois et Ardennais est plus grasse (11,9 et 14,2% de tissu adipeux) et a moins de tissu musculaire (69,2 et 68,2%) que celle des autres chevaux (8,6 à 10,8% de tissu adipeux et 70,8 à 71,9% de tissu musculaire), la croissance relative de ces tissus variant d'une race à l'autre (**Tableau 3**) (Martin-Rosset et al, 1983). C'est ainsi que des chevaux de races différentes atteignent des états d'engraissement similaires pour des poids différents. Ces différences sont plus limitées chez les races légères, au moins pour le muscle (Gunn, 1975). *Pour revue (Martin-Rosset, 2012).*

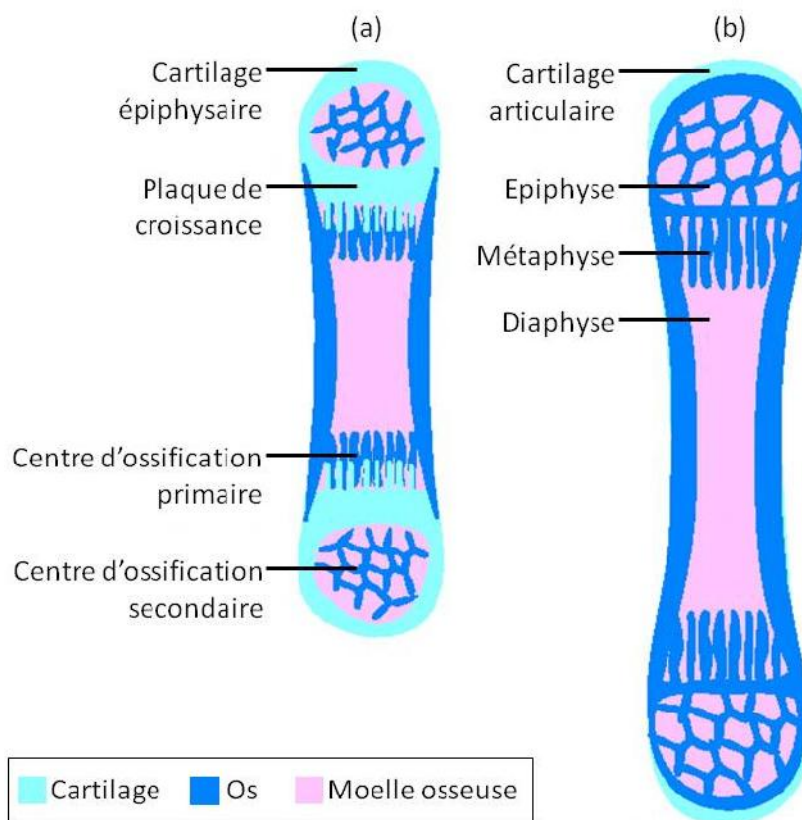
#### **1.1.3.2.2. Sexe**

A la naissance, chez le Pur-Sang anglais, les pouliches sont plus légères et présentent une hauteur au garrot et un périmètre du canon plus petits (Hintz, 1978). Chez le trait belge, elles seraient plus légères de 2,5 à 3,5 kg que les mâles (Martin-Rosset, 1983). Quelle que soit la race, les pouliches atteignent leur taille adulte plus précocement que les mâles (2,5 *versus* 3-4 ans) (Marcq et al, 1956; Heird, 1973), mais des différences existent entre les régions du corps. Jusqu'à 1 an, les pouliches ont un développement plus rapide du poitrail et de la croupe, de la hauteur au garrot et du poitrail et du périmètre thoracique, tandis que les mâles ont un développement plus rapide des membres antérieurs (Heird, 1973). De plus, les pouliches auraient un canon de périmètre restreint par rapport aux mâles Demi-Sang polonais et Pur-Sang arabes à partir de 1,5 ans et par rapport aux mâles traits belges à partir de 2,5-3 ans (Olsson, 1952; Martin-Rosset et Jussiaux, 1977; Martin-Rosset, 1983).

Chez les races de trait, la carcasse des mâles entre 12 et 30 mois est 10% plus lourde, moins grasse et a plus de tissu musculaire que celle des pouliches. La croissance relative du tissu adipeux est similaire entre les mâles et les pouliches et celle du tissu musculaire est

	Mâles	Femelles
<b>Coefficient d'allométrie par rapport au poids vif vide</b>		
<b>Carcasse</b>	1,04	1,04
<b>Muscles</b>	0,91 <sup>a</sup>	1,04 <sup>b</sup>
<b>Tissu adipeux</b>	2,13	2,13
<b>Os</b>	0,71	0,71
<b>Composition de la carcasse à un poids de 356 kg (%)</b>		
<b>Muscle</b>	70,7	70,0
<b>Tissu adipeux</b>	9,4	12,3
<b>Os</b>	15,7	14,9

**Tableau 4.** Variations de la croissance relative des tissus chez les mâles (n=39) et les femelles (n=34) de différentes race trait entre 12 et 30 mois. Au sein d'une même ligne, les valeurs avec des exposants différents (a, b, c, d) sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) (d'après Martin-Rosset et al, 1983 et Martin-Rosset, 2012).



**Figure 14.** Développement et croissance longitudinale de l'os par ossification enchondrale. A. Le centre d'ossification primaire a commencé à s'étendre vers les extrémités de la matrice cartilagineuse et les centres d'ossification secondaire se forment laissant deux zones de matrice cartilagineuse : les plaques de croissance et les cartilages épiphysaires B. Maturité de l'os, les plaques de croissance et les cartilages épiphysaires sont complètement remplacés par l'os (d'après Mackie et al, 2011).

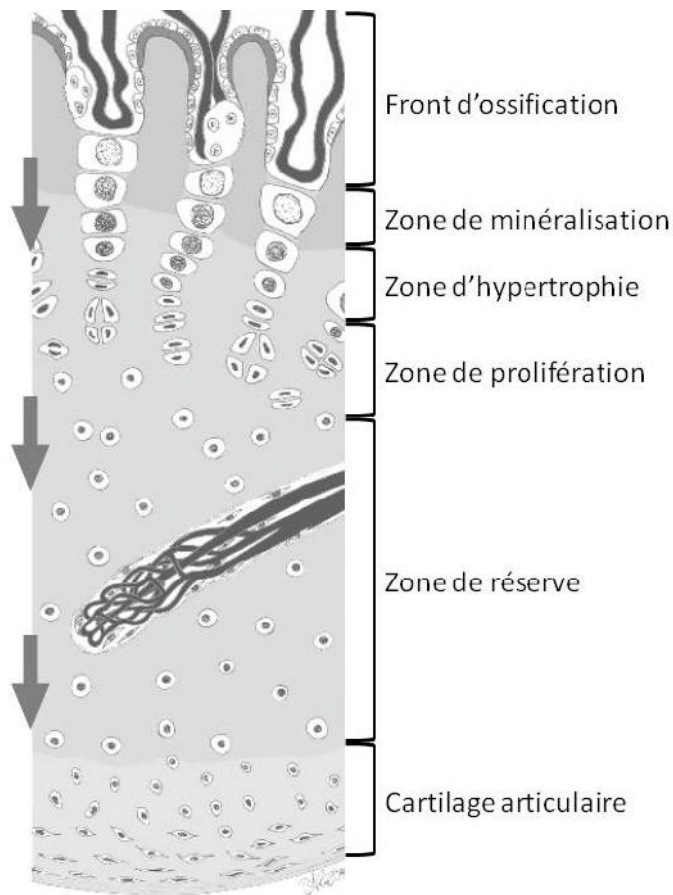
plus importante chez les pouliches (**Tableau 4**) (Martin-Rosset et al, 1983). *Pour revue (Martin-Rosset, 2012).*

### 1.1.3.3. Croissance des os longs et maturation de l'articulation

#### 1.1.3.3.1. Ossification enchondrale

Pendant le développement intra-utérin, le centre d'ossification primaire s'étend vers les extrémités de la matrice cartilagineuse grâce aux ostéoclastes qui résorbent la matrice extracellulaire et aux ostéoblastes qui déposent la matrice osseuse. Dans les os longs, des centres d'ossification secondaires se forment aux extrémités de la matrice cartilagineuse. Ainsi, à la naissance du poulain, le tissu cartilagineux des os longs est complètement transformé en tissu osseux sauf en deux sites : le cartilage articulaire qui assure la mobilité de l'articulation et le cartilage de croissance (**Figure 14**). Le cartilage de croissance est constitué par la plaque de croissance de part et d'autre du centre d'ossification primaire, responsable de la croissance longitudinale des os, ainsi que par le cartilage épiphysaire entre le centre d'ossification secondaire et le cartilage articulaire, qui forme l'extrémité des os. Le cartilage de croissance est remplacé par l'os *via* un processus séquentiel : l'ossification enchondrale.

Le cartilage de croissance est composé de chondrocytes organisés en quatre zones (**Figure 15**). D'abord au repos (zone de réserve) (Kember, 1971; Abad et al, 2002), ils se divisent rapidement (zone de prolifération) et s'organisent en colonnes dans l'axe de l'os (dans la plaque de croissance) ou en clusters (dans le cartilage épiphysaire) (Kember, 1971; Byers et Brown, 2006). Puis, les chondrocytes hypertrophiés et différenciés sécrètent une matrice extracellulaire très spécialisée (dont les collagènes de type II, IX et X et des protéoglycanes) qui permet la minéralisation du cartilage servant de support à la formation osseuse par les ostéoblastes (Farnum et Wilsman, 1989b). Ce stade s'accompagne d'une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, essentielle à la production de vésicules matricielles par les chondrocytes. Ces vésicules ont une membrane riche en annexines qui permettent l'absorption du calcium (Kirsch et al, 2000; Wang et Kirsch, 2002; Anderson, 2003; Wang et al, 2003). Elles sécrètent des phosphates calciques et de l'hydroxyapatite qui minéralisent la matrice. Ce processus, combiné à la faible pression en oxygène et à la sécrétion de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et bFGF (*basic fibroblast growth factor*) par les chondrocytes, attire les vaisseaux sanguins du centre d'ossification (primaire pour la plaque de croissance, secondaire pour le cartilage épiphysaire) (Baron et al, 1994b; Gerber et al, 1999; Schipani et al, 2001). Puis, l'apoptose des chondrocytes laisse des lacunes dont les parois transverses et longitudinales sont résorbées par les chondroclastes ou les ostéoclastes du centre d'ossification (Farnum et Wilsman, 1989a; Lewinson et Silbermann, 1992; Lee et al, 1995; Vu et al, 1998). Simultanément, au front d'ossification, les ostéoblastes déposent la matrice osseuse.



**Figure 15.** Coupe transversale schématique de l'épiphyse. Pendant la croissance, les cellules de la zone de prolifération se divisent en continu et la taille des cellules de la zone hypertrophique augmente : l'os s'allonge donc dans la direction des flèches. Au front d'ossification, les vaisseaux et les cellules osseuses envahissent le cartilage dans cette même direction. Comme la croissance du cartilage est plus lente que la progression du front d'ossification, le cartilage épiphysaire devient de plus en plus fin (d'après Ytrehus et al, 2007).

Ainsi, la croissance longitudinale de l'os est le résultat de la prolifération puis de la différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance. La maturité du squelette est atteinte quand les centres d'ossification primaire et secondaire se rencontrent, scellant la plaque de croissance (**Figure 15**). La fermeture de la plaque de croissance serait en partie liée à un processus de sénescence intrinsèque aux chondrocytes de la zone de réserve qui auraient une capacité de prolifération limitée s'épuisant au cours de l'ossification enchondrale (Baron et al, 1994a; Gafni et al, 2001; Weise et al, 2001; Nilsson et Baron, 2005; Nilsson et al, 2005b). *Pour revue (van der Eerden et al, 2003; Nilsson et al, 2005a; Ytrehus et al, 2007; Mackie et al, 2011).*

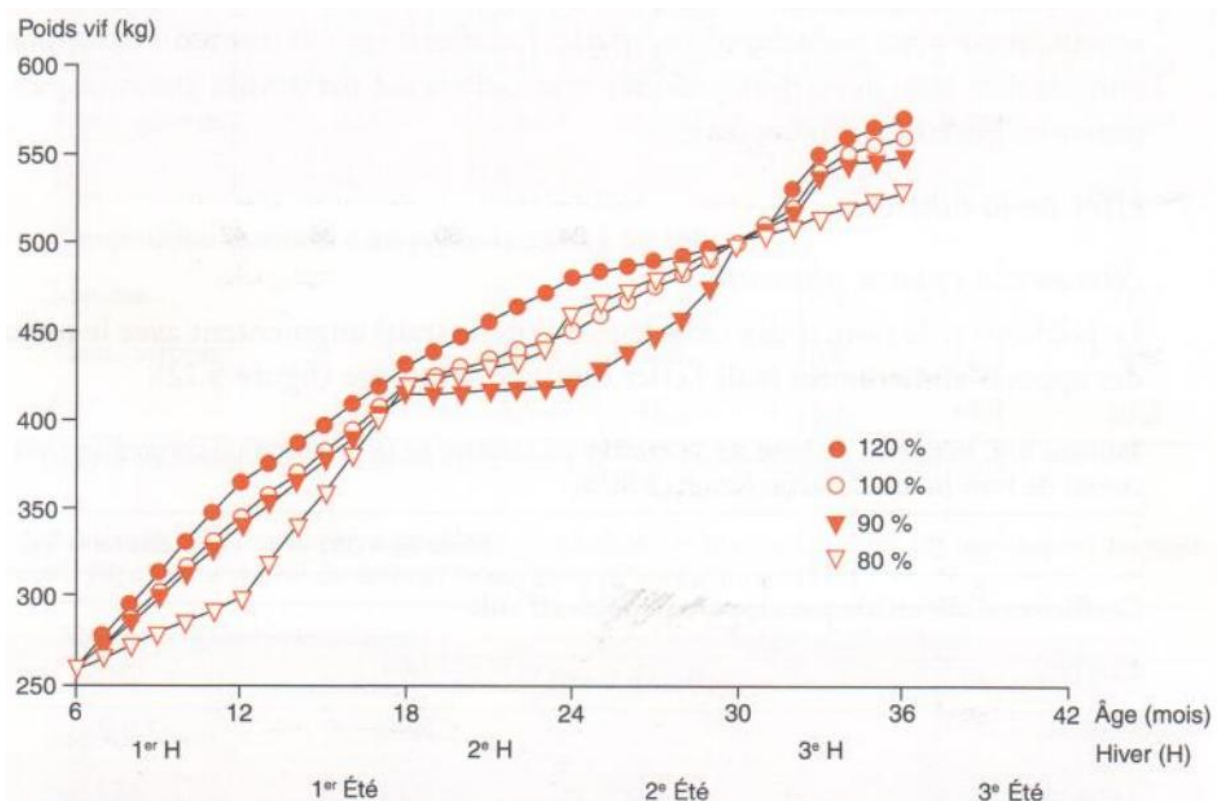
#### **1.1.3.3.2. Contrôle endocrine de l'ossification enchondrale**

Les principales hormones contrôlant la croissance longitudinale des os sont la GH, l'IGF-I, les hormones thyroïdiennes T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> (triiodothyronine et thyroxine), les glucocorticoïdes et, à la puberté, les stéroïdes sexuels (androgènes et œstrogènes). Les données proviennent essentiellement de l'étude des pathologies humaines (déficiences, résistances et excès hormonaux), de l'étude des modèles animaux (ablation des glandes, administration d'hormones, invalidation de gènes) et toujours de la plaque de croissance.

Avant la naissance, l'IGF-I et l'IGF-II modulent la croissance indépendamment de la GH (Baker et al, 1993; Woods et al, 1996). Après la naissance, la GH et l'IGF-I sont les principaux régulateurs de la croissance longitudinale des os. La sécrétion hypophysaire de GH est pulsatile (Veldhuis, 1998) et étroitement contrôlée par la sécrétion hypothalamique de GHRH (*GH releasing hormone*) stimulante et de GHIH (*GH inhibiting hormone*) inhibitrice. La GH stimule la synthèse hépatique d'IGF-I (Salmon et Daughaday, 1957; Daughaday et al, 1972) qui active la prolifération des chondrocytes. Elle agit aussi directement *via* GHR (*GH receptor*) sur les chondrocytes de la zone de réserve qui sécrètent l'IGF-I, alors facteur auto/paracrine d'hypertrophie et de différenciation (Isaksson et al, 1982; Russell et Spencer, 1985; Nilsson et al, 1986; Schlechter et al, 1986; Isaksson et al, 1987; Barnard et al, 1988; Isgaard et al, 1988; Ohlsson et al, 1992b; Werther et al, 1993; Hunziker et al, 1994; Wang et al, 1999; Le Roith et al, 2001; Gevers et al, 2002).

Outre la GH, la T<sub>3</sub> et son précurseur T<sub>4</sub> sont essentiels à la maturation normale de l'os. Elles affectent indirectement la croissance longitudinale des os *via* la GH, mais aussi directement *via* TR<sub>α1</sub> et TR<sub>β1</sub> (*T<sub>3</sub> receptors α1 et β1*) sur les chondrocytes des zones de réserve et de prolifération (Ballock et al, 1999; Gauthier et al, 1999; Gothe et al, 1999). La T<sub>3</sub> stimule le recrutement des cellules entre ces deux zones, facilite leur différenciation (Burch et Van Wyk, 1987; Lewinson et al, 1994; Wakita et al, 1998), stimule l'expression locale d'IGF-I *via* la régulation de l'expression de GHR (Burch et Van Wyk, 1987; Ohlsson et al, 1992a; Tsukada et al, 1998; Kindblom et al, 2001). Son précurseur T<sub>4</sub> stimule aussi la prolifération et la différenciation des chondrocytes et induit l'expression des collagènes de type II et X, l'activité de la phosphatase alcaline (marqueur de la différenciation) et





**Figure 16.** Effet du niveau des apports alimentaires (80, 90, 100 ou 120% des besoins) sur le poids vif de poulains de race selle au cours de trois hivers (H) entre 6 mois (sevrage) et 42 mois (d'après Bigot et al, 1987 et Trillaud-Geyl et al, 1990 dans Martin-Rosset, 2012).

l'hypertrophie des chondrocytes (Smeets et van Buul-Offers, 1986; Ohlsson et al, 1992a; Okubo et Reddi, 2003).

Les glucocorticoïdes inhibent la prolifération des chondrocytes et la synthèse de matrice extracellulaire *via* GR (*glucocorticoids receptor*) sur les chondrocytes de la zone de prolifération et d'hypertrophie (Allen, 1996; Silvestrini et al, 1999; Abu et al, 2000; Silvestrini et al, 2000; Chrysis et al, 2003). Ils inhibent aussi la croissance en modulant le système GH/IGF-I à différents niveaux. Outre leur action inhibitrice sur la sécrétion hypophysaire de GH, les glucocorticoïdes diminuent l'expression de GHR, IGF-I et IGF-IR (*IGF-I receptor*) et diminuent la synthèse d'ADN dans les chondrocytes. Ils diminuent aussi l'expression d'IGFBP-5 (*IGF binding protein*), médiateur de l'activité mitogène d'IGF-I, et augmentent celle d'IGFBP-3, inhibiteur de la croissance (Luo et Murphy, 1989; Itagane et al, 1991; Smink et al, 2002; Smink et al, 2003). Les glucocorticoïdes modulent aussi les concentrations en T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> en régulant l'activité de la déiodinase dans les reins et le foie et son expression dans les chondrocytes (Heyma et Larkins, 1982; Cavalieri et al, 1984; Miura et al, 2002).

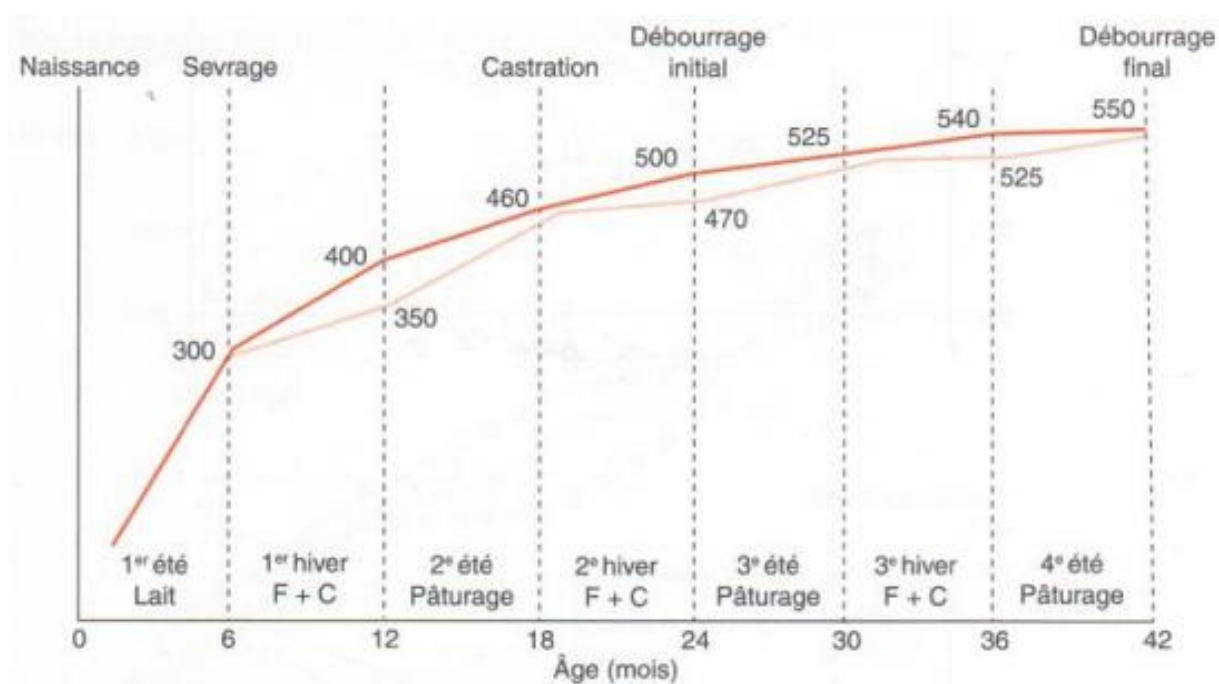
Les œstrogènes inhibent la croissance longitudinale des os en induisant la fermeture de la plaque de croissance, indépendamment de la GH. Ils diminuent la synthèse de matrice extracellulaire et modulent l'activité des chondrocytes *via* ER<sub>α</sub> (*estrogens receptor*) et ER<sub>β</sub> (Braidman et al, 1995; Kusec et al, 1998; Kennedy et al, 1999; Nilsson et al, 1999; Nilsson et al, 2002; van der Eerden et al, 2002; Nilsson et al, 2003; Chagin et al, 2004). *A contrario*, les androgènes stimulent la croissance longitudinale des os *via* AR (*androgens receptor*) sur les chondrocytes de la zone d'hypertrophie (Abu et al, 1997) en augmentant l'expression d'IGF-I et d'IGF-IR (Maor et al, 1999; Zung et al, 1999; Phillip et al, 2001). De plus, les chondrocytes expriment l'aromatase responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes dont les effets sont décrits ci-dessus (Oz et al, 2001).

Enfin, les chondrocytes des zones de prolifération et d'hypertrophie sécrètent de la leptine et ceux de la zone d'hypertrophie expriment son récepteur ObRb. La leptine amplifie les effets de la T<sub>3</sub> sur la maturation des chondrocytes *via* la voie IGF-I/IGF-IR dont elle augmente l'expression. Elle jouerait aussi un rôle angiogénique. D'autre part, la leptine stimule l'expression de TR<sub>α1</sub> et la T<sub>3</sub> augmente l'expression d'ObRb (Kume et al, 2002; Morroni et al, 2004; Wang et al, 2011). *Pour revue* (van der Eerden et al, 2003; Nilsson et al, 2005a; Mackie et al, 2011).

#### **1.1.3.4. Effets des apports alimentaires chez le jeune cheval**

##### **1.1.3.4.1. Effets des apports alimentaires sur la croissance**

Le poids vif et le format des chevaux des races selle et trait augmentent avec les apports alimentaires, mais cet effet s'atténue avec l'âge (**Figure 16**) (Bigot et al, 1987; Trillaud-Geyl et Martin-Rosset, 1990). Ces observations illustrent l'évolution des besoins du



**Figure 17.** Croissance compensatrice estivale et croissance hivernale chez des poulains de race selle de 6 à 42 mois. Les animaux sont conduits au pâturage l'été et reçoivent du foin et des concentrés (F+C) l'hiver (d'après Bigot et al, 1987 et Trillaud-Geyl et al, 1990 dans Martin-Rosset, 2012).

poulain en fonction des tranches d'âge. En particulier, son poids vif au sevrage détermine l'évolution future de son format. Les apports alimentaires doivent donc y être adaptés. Les poulains recevant des apports alimentaires modérés *versus* élevés (au cours de trois hivers successifs entre 6 et 42 mois) réalisent au pâturage une croissance compensatrice leur permettant presque d'atteindre le même poids vif au même âge. Cette capacité à compenser leur retard de croissance diminue avec l'âge (**Figure 17**) (Bigot et al, 1987; Trillaud-Geyl et Martin-Rosset, 1990).

La nature du régime alimentaire est déterminante dans la croissance du poulain. Jusqu'à l'âge de 2 mois, le GMQ du poulain est directement lié à la quantité de lait ingérée (Martin-Rosset, 1983), puis il diminue car les quantités ingérées et l'utilisation digestive de l'herbe par le poulain ne compensent pas encore cette restriction des apports par le lait (von Nesen et al, 1958). Le GMQ augmente de 18% au sevrage quand le poulain est supplémenté avec 2 kg de concentrés depuis l'âge de 4 mois. Après le sevrage, le GMQ est étroitement lié à la nature du fourrage de base : entre le sevrage et l'âge de 3 ans, le GMQ est plus important avec des régimes à base d'ensilage de maïs ou d'enrubannés qu'avec des régimes à base de foin *ad libitum* et supplémentés (Trillaud-Geyl et Martin-Rosset, 2005). De plus, la composition corporelle des poulains de trait à 12 mois est très sensible à la nature du régime : les poulains recevant de l'ensilage de maïs sont plus lourds de 5% et présentent une carcasse plus grasse (+22% de tissu adipeux) que les poulains recevant un régime à base de foin à partir du sevrage (Agabriel et al, 1982). Le GMQ augmente avec l'apport azoté de la ration à apport énergétique égal et lorsque les besoins en acides aminés essentiels sont couverts (Breuer et Golden, 1971; Hintz et al, 1971; Borton et al, 1973; Pulse et al, 1973; Yoakam et al, 1978; Ott et al, 1979). *Pour revue (Martin-Rosset, 2012).*

#### **1.1.3.3.2. Apports alimentaires et qualité du tissu osseux**

Les apports alimentaires et la croissance pondérale qui en découle influencent le développement du tissu osseux et ses propriétés biomécaniques. En effet, les poulains de race selle recevant 100 *versus* 150% des apports recommandés par l'INRA présentent une croissance maximale *versus* modérée entre la naissance et 1 an. Les poulains les plus alimentés sont plus lourds, avec un os du canon plus large dont la densité minérale est accrue. De plus, les travées osseuses sont moins nombreuses et plus espacées (Martin-Rosset, 1983; Donabedian et al, 2006). D'autre part, les poulains de race selle ayant une croissance modérée *versus* limitée (450 *versus* 350 g/jour) entre 6 et 24 mois voient le cortex de leur os du canon s'épaissir de 20% et ses moments d'inertie augmenter de 37% (Bigot et al, 1990).

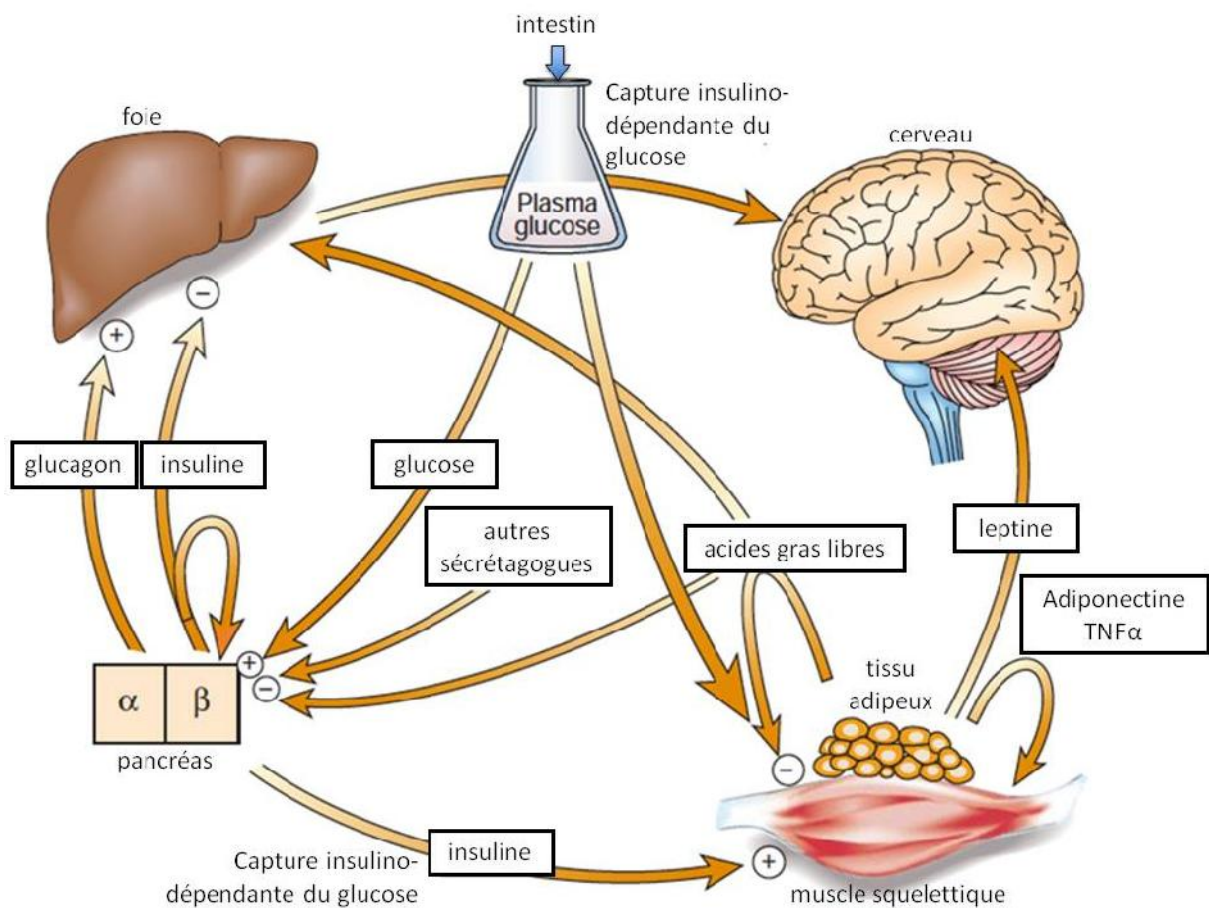


## En résumé

De la conception à la parturition, ces rappels physiologiques et endocrinologiques mettent en exergue les adaptations nécessaires au maintien du développement de l'embryon puis du fœtus équin. Cette succession complexe d'évènements aboutit notamment à la mise en place d'une placentation diffuse et épithéliochoriale, acteur essentiel de la relation mère-fœtus.

Les effets des apports alimentaires sur la fertilité et la production laitière en quantité et qualité, soulignent l'importance de l'alimentation de la jument dès la conception, en fin de gestation et pendant la lactation pour la croissance fœtale et post-natale du poulain.

La croissance du cheval est rapide car le poulain atteint 65% de son poids adulte et 88% de sa taille adulte à l'âge d'un an. Dès lors, la connaissance des mécanismes de la croissance des os longs et de la maturation du cartilage prend tout son sens dans l'étude des pathologies ostéoarticulaires du jeune. Ici aussi, les effets de la nature du régime alimentaire dénotent de la sensibilité de la période post-natale aux *stimuli* environnementaux.



**Figure 18.** Contrôle de l'homéostasie énergétique par les organes. Les cellules  $\beta$  du pancréas sécrètent de l'insuline en réponse à l'augmentation de la concentration sanguine en glucose. L'insuline diminue la production hépatique de glucose et augmente la capture, l'utilisation et le stockage du glucose dans les muscles et le tissu adipeux. Les adipocytes sécrètent des acides gras libres qui diminuent la capture du glucose dans les muscles, la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  et augmentent la production de glucose hépatique. Le tissu adipeux sécrète aussi des adipokines comme la leptine, l'adiponectine et  $\text{TNF}\alpha$  qui régulent la prise alimentaire, la dépense énergétique et la sensibilité à l'insuline (d'après Saltiel et al, 2001).

## 1.2. Insulinorésistance et ostéochondrose chez l'équin, dialogue entre les métabolismes énergétique et osseux

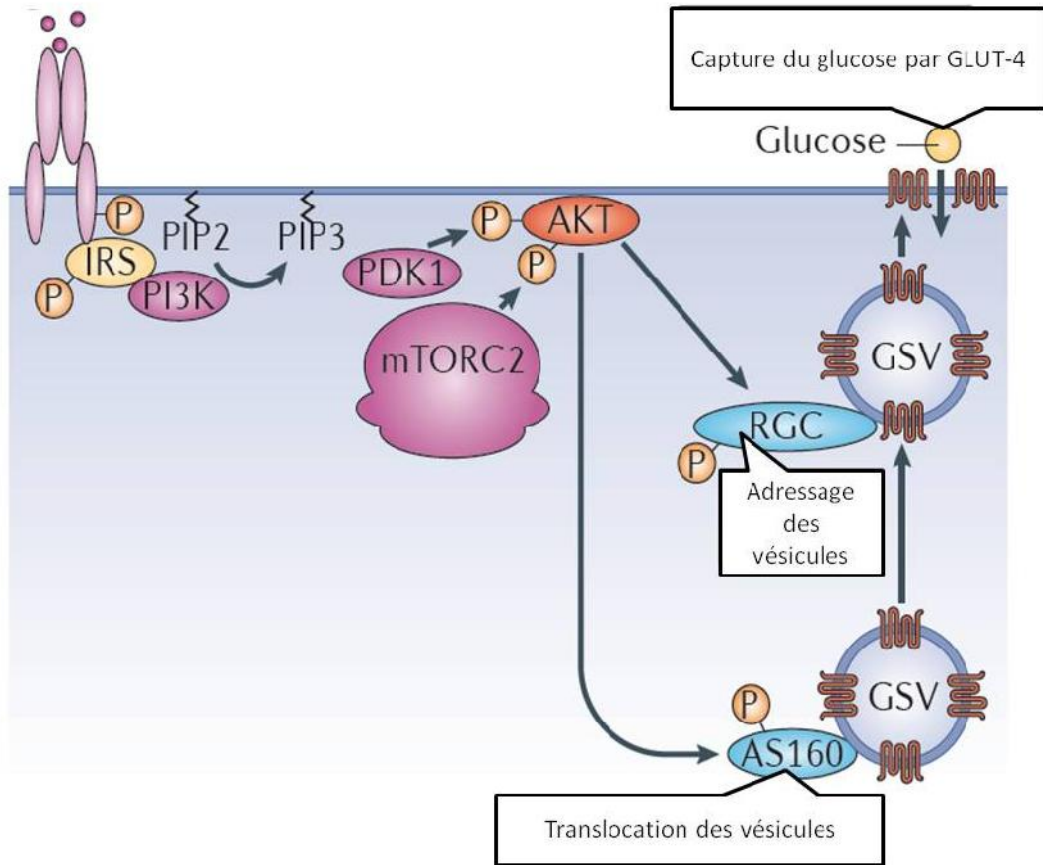
### 1.2.1. Insulinorésistance chez l'équin

#### 1.2.1.1. Contrôle de l'homéostasie énergétique par l'insuline

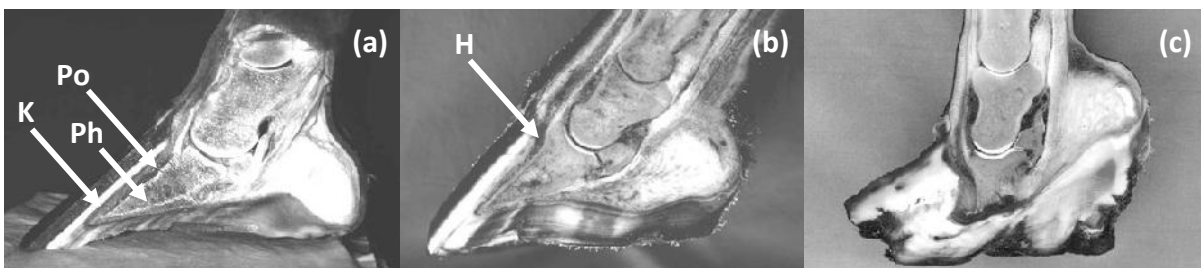
L'homéostasie énergétique est sous le contrôle d'un ensemble d'organes dont le tractus digestif et en particulier le pancréas, le cerveau, le foie, le muscle et le tissu adipeux (**Figure 18**). L'insuline est une hormone anabolique sécrétée par les cellules  $\beta$  du pancréas quand les concentrations sanguines en glucose ou en acides aminés sont élevées. Elle stimule la conversion des monosaccharides (dont le glucose) et des acides aminés en molécules complexes (glycogène, protéines, lipides). Cet effet passe en grande partie par l'augmentation de la capture du glucose dans les muscles et dans le tissu adipeux. La capture du glucose a lieu principalement dans les muscles squelettiques, où l'énergie est stockée sous forme de glycogène. Le glucose est libéré lorsque la demande énergétique est élevée ou lorsque la glycémie est basse. Environ 10% de la capture du glucose ont lieu dans le tissu adipeux, où l'énergie est stockée sous forme de triglycérides. Les acides gras sont libérés lorsque la demande énergétique est élevée. Le tissu adipeux a aussi une fonction endocrine car il sécrète des adipokines (leptine, adiponectine, résistine) ou encore le transporteur de la vitamine A, RBP4 (*retinol binding protein 4*). Ces facteurs informent les autres organes (foie, muscles) du statut énergétique de l'organisme, ce qui a pour effet de modifier leur consommation d'énergie. Cette information est notamment relayée par le cerveau. *Pour revue (Saltiel et Kahn, 2001).*

Le récepteur de l'insuline comprend deux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires qui lient l'hormone et deux sous-unités  $\beta$  intracellulaires. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation des sous-unités  $\beta$  et active des tyrosines kinases. Ce mécanisme entraîne une cascade complexe de phosphorylations schématisée dans la **Figure 19** (White et Yenush, 1998; Farese et al, 2005; Taniguchi et al, 2006; Sale et Sale, 2008), dont le résultat est la translocation des transporteurs du glucose (GLUT4, *glucose transporter 4* ou SLC2A4, *solute carrier family 2 member 4*) des vésicules de stockage intracellulaires (GSV, *GLUT4 storage vesicle*) vers la surface cellulaire (Bandyopadhyay et al, 2002; Sano et al, 2003; Farese et al, 2007). GLUT4 est un des 14 membres de la famille des GLUT qui sont des transporteurs transmembranaires des hexoses (transport facilité). Chacun de ces transporteurs a une affinité différente pour chaque hexose, ainsi qu'une localisation tissulaire et subcellulaire et une fonction physiologique spécifiques. GLUT4 est surtout exprimé dans les muscles et les adipocytes. En l'absence d'insuline, seul 5% des transporteurs GLUT4 sont présents à la surface de la cellule, la majeure partie étant dans les





**Figure 19.** Schéma des mécanismes intracellulaires de réponse à l'insuline. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne la phosphorylation des résidus tyrosine des protéines IRS (*insulin receptor substrate*) qui induit le recrutement et l'activation de la PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase). Cette kinase convertit le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate), permettant le recrutement de la PDK1 (phosphatidylinositol-3 dependent kinase 1) et de l'AKT (protéine kinase B). Une fois au niveau de la membrane plasmatique, l'AKT est phosphorylée par la PDK1 et par mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) et devient active. L'AKT phosphoryle et inactive l'AS160 (160 kDa AKT substrate) et le RGC (*RAL-GAP complex*) qui régulent des GTPases impliqués respectivement dans la rétention et l'adressage des GSV (*GLUT4 storage vesicle*). L'AKT induit donc l'exocytose des GSV (d'après Leto et Slatiel, 2012).



**Figure 20.** Coupe sagittale d'un pied de cheval. (a) Pied normal, la troisième phalange (Ph) est maintenue en place dans la boîte cornée par les liens étroits entre le podophylle (Po) et le kératophylle (K). (b) Pied en début de fourbure, avec un hématome (H) entre le podophylle et le kératophylle, la troisième phalange étant encore en place. (c) Pied présentant une fourbure grave, sans cohésion entre le podophylle et le kératophylle, avec rotation de la troisième phalange dont la pointe s'est cassée.

endosomes, l'appareil de Golgi et les GSV (Slot et al, 1991). *Pour revue (Thorens et Mueckler, 2010; Leto et Saltiel, 2012).*

### 1.2.1.2. Définition de l'insulinorésistance

L'insulinorésistance (IR) est définie par une insensibilité de la surface cellulaire et des dysfonctionnements internes aux cellules sensibles à l'insuline, en particulier dans le muscle, le tissu adipeux et le foie. Cet état physiologique correspond à une diminution des effets de l'insuline sur ses tissus cibles et peut intervenir en amont ou en aval du récepteur cellulaire de l'insuline (Kahn, 1978).

En amont, la diminution de la réponse à l'insuline pourrait être liée à une dégradation rapide de l'hormone ou à sa neutralisation par des anticorps, diminuant les concentrations en insuline circulante. Ce sont cependant les altérations de la transduction du signal qui sont les plus fréquentes. L'IR peut être causée par une diminution de l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline et de l'activité tyrosine kinase, entraînant une diminution de la phosphorylation d'IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) et de l'activité de la PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) (**Figure 19**) (Smith et al, 1997; Zierath et al, 1997; Lamothe et al, 1998). De plus, des perturbations du métabolisme intracellulaire du glucose, régulé par diverses enzymes comme l'hexokinase et la glycogène synthase, pourraient réduire la capture et le stockage du glucose dans les cellules (Smith et al, 1997; Zierath et al, 1997; Lamothe et al, 1998; Saltiel et Kahn, 2001; Perseghin et al, 2003). Il serait alors plus précis de parler d'une perte d'efficacité de l'insuline plutôt que d'une perte de sensibilité à l'insuline. *Pour revue (Kronfeld et al, 2005; Choi et Kim, 2010).*

La diminution de la sensibilité à l'insuline et l'hyperglycémie qui en résultent sont en général compensées de deux façons : *via* une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas afin de maintenir une capture insulino-dépendante optimale du glucose ou *via* une augmentation passive de la capture du glucose induite par l'augmentation de la glycémie (Kronfeld et al, 2005).

### 1.2.1.3. Insulinorésistance et pathologies métaboliques chez l'équin

#### 1.2.1.3.1. Insulinorésistance et fourbure

La fourbure est une affection des tissus mous du pied, touchant le plus souvent les membres antérieurs. Elle correspond à une inflammation des structures lamellaires aboutissant à la rupture des interdigitations unissant le podophylle au kéraphylle (**Figure 20**) (Pollitt, 1996; French et Pollitt, 2004a), ces membranes étant le seul lien entre la boîte cornée et l'os de la troisième phalange. Les forces exercées par le poids du corps et la tension exercée par le tendon fléchisseur profond du doigt peuvent alors entraîner une descente ou une rotation de cette dernière dans la boîte cornée (**Figure 20**). Cette affection



est très douloureuse et le cheval marche difficilement voire reste couché et refuse de se lever. Son traitement est toujours une urgence médicale. En 2000 aux Etats-Unis, 13% des consultations se rapportaient à des cas de fourbure, avec une prévalence de 2,1% (USDA, 2000). Une prévalence de 6,4% a été rapportée chez les chevaux très âgés (étude rétrospective de 467 chevaux de plus de 20 ans, principalement des poneys) (Brosnahan et Paradis, 2003), jusqu'à 7,1% dans une cohorte de 113 000 chevaux au Royaume-Uni (Hinckley et Henderson, 1996) et même 35% dans une étude prospective de 577 chevaux au Royaume-Uni (Wylie et al, 2013). A l'origine de 15% des boiteries, la fourbure freine la performance sportive de l'animal et, dans les cas les plus sévères, conduit à son euthanasie. *Pour revue (Wylie et al, 2011).*

L'IR est impliquée dans la pathogénie de la fourbure. D'une part, les chevaux âgés atteints du syndrome de Cushing (ou *pituitary pars intermedia dysfunction*, PPID), caractérisé par un hypercorticisme, sont prédisposés à la fois à l'IR et à la fourbure, ce qui suggère un lien entre ces deux états (Garcia et Beech, 1986; Donaldson et al, 2004). D'autre part, une diminution de la sensibilité à l'insuline, compensée par une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas, est largement démontrée chez les poneys atteints de fourbure (Jeffcott et al, 1986; Hess et al, 2005; Treiber et al, 2005a; Treiber et al, 2005b; Treiber et al, 2005c).

Un lien a été établi entre les modifications du microbiote intestinal et l'apparition d'une fourbure *via* l'administration d'une dose supra-physiologique d'oligofructose par intubation. Le suivi des populations bactériennes caecale et fécale pendant plusieurs jours a montré une prolifération des streptocoques avant l'apparition des premiers signes de fourbure. La mort de ces bactéries entraîne la libération de composés cellulaires (exotoxines, endotoxines, amines) en partie responsables de la pathogénie de la fourbure (Milinovich et al, 2007; Milinovich et al, 2008a; Milinovich et al, 2008b), en association avec une IR selon plusieurs mécanismes possibles. Tout d'abord, le microbiote intestinal perturbé sécrète des protéases, activant des collagénases qui dégradent le tissu conjonctif du pied. En particulier, les métalloprotéinases matricielles (ou *matrix metalloproteinases*, MMP) 2 et 9 ont un rôle central dans la pathogénie de la fourbure (Mungall et al, 2001; Kyaw-Tanner et Pollitt, 2004). Chez l'Homme, l'insuline inhibe l'expression de MMP-9, tandis que le glucose la stimule (Dandona et al, 2003; Aljada et al, 2004). L'IR, associée à une intolérance au glucose, contribuerait à l'activité des MMP et à la dégradation des membranes (French et Pollitt, 2004b). D'autre part, le microbiote intestinal perturbé sécrète des lipopolysaccharides aux effets défavorables sur l'irrigation sanguine du pied (Zerpa et al, 2005). En effet, ils augmentent l'expression de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) qui induit une IR (Hotamisligil, 1999b, a). Chez l'Homme, l'insuline stimule la sécrétion de l'interleukine 6 (IL-6) pro-inflammatoire par le tissu adipeux (Krogh-Madsen et al, 2004a; Krogh-Madsen et al, 2004b). L'hyperinsulinémie compensatoire serait susceptible d'amplifier cet effet pro-inflammatoire. De plus, chez l'Homme, l'insuline a une action vasodilatatrice



**Figure 21.** Photographie d'un poney obèse dont l'état corporel est estimé à 9 sur 9 (A) et d'un cheval très maigre dont l'état corporel est estimé à 2 sur 9 (d'après Johnson et al, 2009).

via l'oxyde nitrique (Zeng et Quon, 1996) et inhibe l'action vasoconstrictrice de l'endothéline-1 (Juan et al, 2004; Kolka et al, 2005). Ces effets vasodilatateurs et vasoconstricteurs seraient respectivement réduits en cas d'IR et amplifiés en cas d'hyperinsulinémie compensatoire. Enfin, l'IR altérerait le transport du glucose dans les kératinocytes et provoquerait directement la rupture des membranes conjonctives liant la boîte cornée à l'os (Pass et al, 1998; Mobasher et al, 2004). *Pour revue (Treiber et al, 2006a).*

#### **1.2.1.3.2. Insulinorésistance et obésité**

L'IR est associée à un second syndrome, plus difficile à définir. Les chevaux atteints sont qualifiés d'« *easy keepers* » car ils parviennent à maintenir un poids vif constant malgré un régime alimentaire hypocalorique. Cet état est observé le plus souvent chez les poneys, les chevaux Morgans, Paso Fino et Fjords, mais aussi chez les chevaux Arabes, American Saddlebred, les Quarter Horses et les Tennessee Walking Horses (Frank, 2006). Certains de ces animaux présentent une obésité généralisée (**Figure 21**), tandis que d'autres ne montrent qu'une accumulation de graisse localisée au niveau de la crête ou de part et d'autre de la base de la queue.

L'épidémie d'obésité chez le cheval se développe parallèlement à l'épidémie d'obésité chez l'Homme (Wyse et al, 2008). Les conditions modernes d'élevage imposent au cheval domestique une inactivité physique, couplée à des rations trop riches en énergie, d'une part sous forme de concentrés et d'autre part sous forme de fourrages, composés de plantes améliorées génétiquement pour les besoins des animaux de production, en particulier le bétail (<http://safergrass.org/>). Ces fourrages dont le but est de favoriser un gain de poids rapide sont particulièrement riches en glucides non structuraux tels que l'amidon (Longland et Byrd, 2006). Or, le métabolisme du cheval favorise la prise alimentaire et l'accumulation de tissu adipeux à l'approche de l'hiver. Chez les herbivores, cette stimulation de l'appétit et de l'adipogenèse est sous le contrôle de la proopiomélanocortine (POMC) sécrétée par l'hypophyse (Ssewanyana et al, 1990; Donaldson et al, 2005). Il est important de noter que la prévalence de l'obésité est sous-estimée par les vétérinaires et les propriétaires, un certain degré d'embonpoint étant jugé acceptable, voire désirable. Une prévalence de 1,4% dans une population de 2 904 chevaux a été rapportée par des propriétaires aux Etats-Unis en 1998 (USDA, 1998), alors qu'en Ecosse 45% des 319 chevaux de selle évalués par des expérimentateurs et des propriétaires étaient considérés comme obèses (Wyse et al, 2008). Enfin, au Royaume Uni, Harris et ses collègues ont rapporté une prévalence de 21%, évaluée par des expérimentateurs, chez 331 chevaux de loisir (Harker et al, 2011). De plus, cette prévalence varie avec les saisons puisqu'au Royaume Uni, elle est de 27% à la fin de l'hiver et de 35% à la fin de l'été (Giles et al, 2014). Outre une accumulation de graisse, l'obésité altère entre autres les capacités sportives de l'animal (Garlinghouse et Burrill, 1999; Kearns et al, 2002), sa régulation thermique (Cymbaluk et Christison, 1990) et ses performances à la reproduction (Henneke et al, 1984; Nagy et al, 1998; Fitzgerald et al, 2003). *Pour revue (Johnson et al, 2009).*

Selon la définition de l'IDF, un individu a un syndrome métabolique s'il présente :	
<b>Obésité centrale</b> (définie par le tour de taille*, propre au groupe ethnique) <i>+ deux des facteurs suivants :</i>	
<b>Taux élevé en triglycérides</b>	≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) ou traitement spécifique de ce trouble lipidique
<b>Faible taux de cholestérol HDL</b>	< 40 mg/dL (1,03 mmol/L) chez les hommes < 50 mg/dL (1,29 mmol/L) chez les femmes ou traitement spécifique de ce trouble lipidique
<b>Hypertension</b>	Systolique ≥ 130 mmHg ou diastolique ≥ 85 mmHg ou traitement d'une hypertension diagnostiquée précédemment
<b>Glycémie à jeun élevée</b>	Glycémie à jeun ≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/L) ou diabète de type II diagnostiqué précédemment Au-delà de 5,6 mmol/L ou 100 mg/dL, un test oral de tolérance au glucose est fortement recommandé mais pas nécessaire

**Tableau 5.** Définition du syndrome métabolique par l'IDF (*International Diabetes Federation*). \*Si l'Indice de Masse Corporelle (IMC) ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>, l'obésité centrale peut être supposée et il n'est pas nécessaire de mesurer le tour de taille (d'après IDF, 2014).

L'IR et l'obésité sont fortement liées (Hoffman et al, 2003; Vick et al, 2007). La leptine, sécrétée majoritairement par le tissu adipeux (Kearns et al, 2006), est très liée à l'état corporel du cheval (Buff et al, 2002; Gentry et al, 2002). Le pic postprandial d'insulinémie induit un pic de leptinémie 8 à 10 heures plus tard (Cartmill et al, 2003a; Cartmill et al, 2005; Gordon et McKeever, 2005). L'hyperinsulinémie compensatoire associée à l'IR stimulerait donc la sécrétion de leptine (Carantoni et al, 1998). Chez le rat et la souris, l'augmentation de la leptinémie diminue la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas (Pallett et al, 1997) et la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux et du foie, réduisant ainsi la capture du glucose, la glycogénèse et la lipogénèse (Cohen et al, 1996; Muller et al, 1997; Harris, 1998). Ainsi, la leptine restreint le stockage de glucose sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux et prévient l'accumulation de graisse (Ceddia et al, 2002). La disponibilité accrue en glucose augmente la capture insulinodépendante du glucose dans les cellules musculaires (Harris, 1998). La leptine aurait donc un rôle central dans le maintien de la sensibilité à l'insuline (Perez et al, 2004). En résumé, l'insuline stimule l'accumulation de graisse et la sécrétion de leptine, ce qui entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline (Seufert et al, 1999). *Pour revue (van Weyenberg, 2008).*

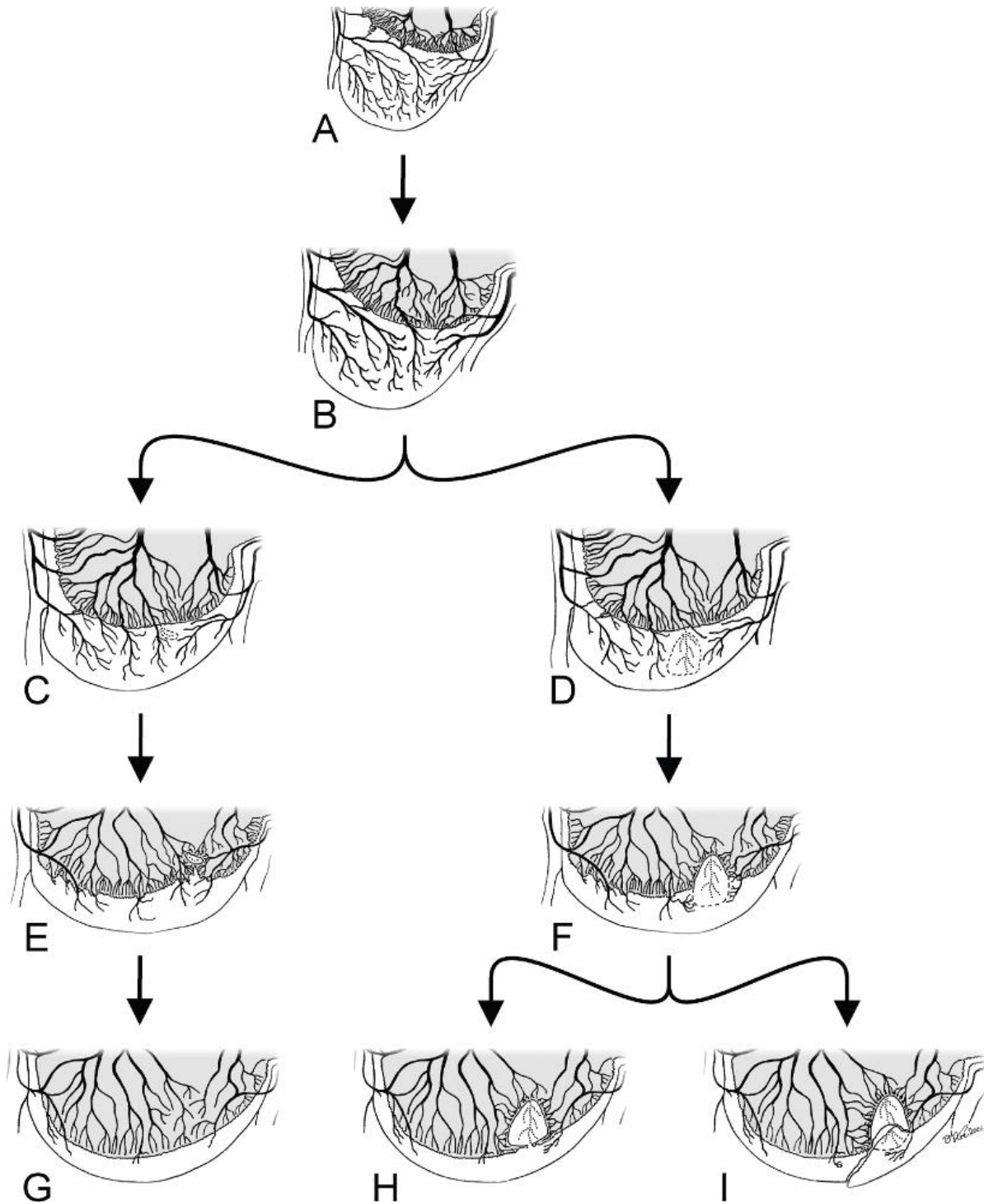
Les chevaux obèses présentent une leptinémie élevée (Buff et al, 2002; Gentry et al, 2002). Chez le rat (adipocytes *in vitro*), la leptine inhibe le signal insulinaire et induit une IR du tissu adipeux (Perez et al, 2004). Cette dernière serait déterminante dans la généralisation de l'IR à l'ensemble des organes (Smith, 2002). Notons toutefois que d'autres facteurs sont susceptibles d'être à l'origine de l'IR associée à l'obésité, tels que les acides gras non-estérifiés (Ferrannini et al, 1983), des cytokines pro-inflammatoires (Vick et al, 2007) ou encore l'adiponectine (Weyer et al, 2001).

#### **1.2.1.3.3. Notion de syndrome métabolique équin**

La notion de syndrome métabolique équin (ou *equine metabolic syndrome*, EMS) a été introduite en 2002 lorsque Johnson a émis l'hypothèse que l'IR, la fourbure et l'obésité feraient partie d'un même syndrome clinique chez les chevaux et les poneys (Johnson, 2002). L'EMS fait écho au syndrome métabolique en médecine humaine (Camus, 1966; Kaplan, 1989; Ertelt et al, 2014), défini par un ensemble de facteurs de risque prédictifs du développement d'une insuffisance coronarienne ou d'un diabète de type II (**Tableau 5**) (IDF, 2014).

Chez l'équin, le phénotype associé à l'EMS comprend une IR caractérisée par une hyperinsulinémie ou des réponses glycémique et insulinémique anormales lors des tests oraux ou intraveineux de tolérance au glucose et/ou de sensibilité à l'insuline, une prédisposition à la fourbure et une accumulation de graisse locale (au niveau de la crête, à la base de la queue, derrière l'épaule, dans la région du prépuce ou de la glande mammaire) ou généralisée (obésité) (Frank et al, 2010). Quelques facteurs peuvent s'y ajouter, tels qu'une hypertriglycéridémie (Frank et al, 2006; Treiber et al, 2006b; Carter et al, 2009), une





**Figure 22.** Schémas de la coupe transversale de l'épiphyse au cours de l'ossification enchondrale. A : les canaux cartilagineux irriguent le cartilage épiphysaire. B : le front d'ossification rencontre les canaux cartilagineux et les vaisseaux s'anastomosent. C et D : le cartilage se nécrose en leur absence. C, E et G : ce défaut est résorbé quand le front d'ossification l'atteint. D : ce défaut résiste à l'invasion vasculaire et à l'ossification. F : un fragment de cartilage nécrosé persiste tandis que le front d'ossification progresse de part et d'autre. H : cette lésion peut être complètement entourée de tissu osseux. I : dans d'autres cas, le cartilage articulaire se rompt (d'après Ytrehus et al, 2007).

hyperleptinémie (Cartmill et al, 2003b), une hypertension artérielle (Bailey et al, 2008), des altérations du cycle de la jument (Gentry et al, 2002; Vick et al, 2006) et une augmentation des marqueurs de l'inflammation associés à l'obésité (Vick et al, 2007).

## 1.2.2. Ostéochondrose chez l'équin

### 1.2.2.1. Définition de l'ostéochondrose chez l'équin

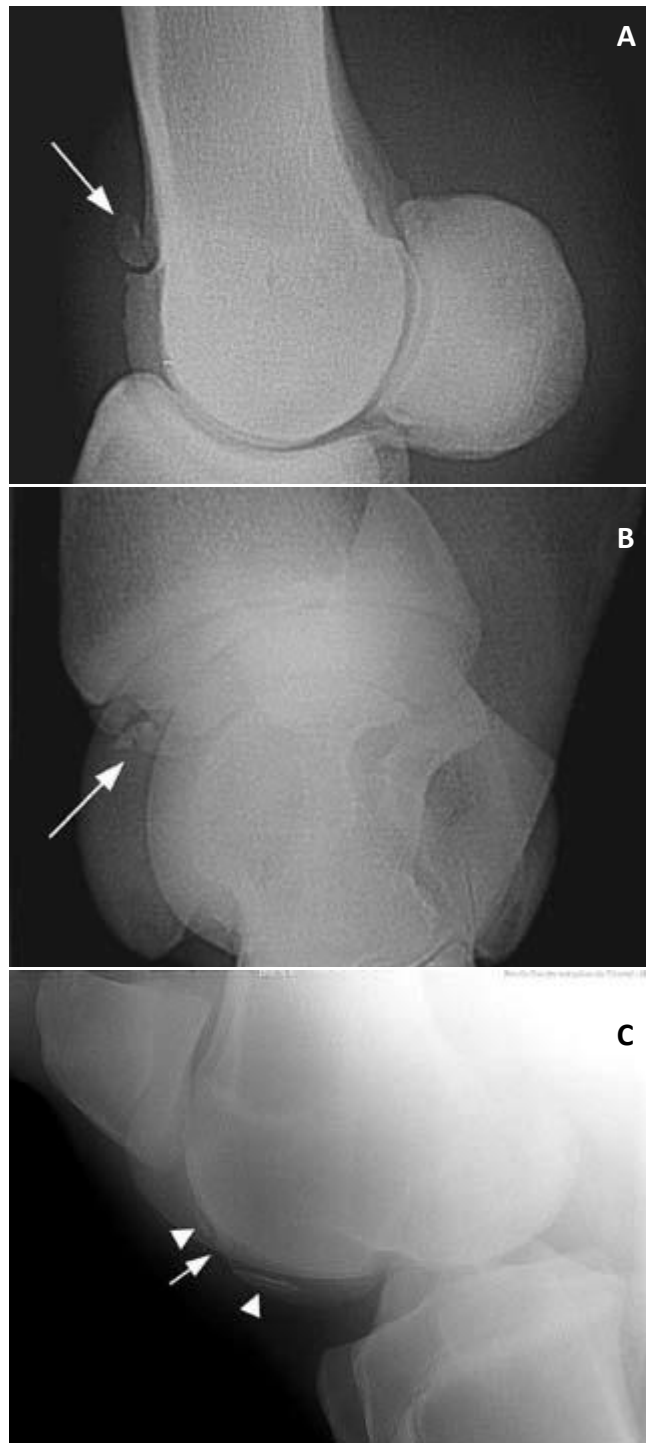
#### 1.2.2.1.1. Terminologie

L'ostéochondrose (OC) est une affection ostéoarticulaire juvénile (AOAJ). Elle se développe avant l'âge de 1 an. Les AOAJ sont les pathologies caractérisées par des anomalies du développement osseux identifiées chez les animaux n'ayant pas atteint leur maturité squelettique : lésions du syndrome de Wobbler, affections tendineuses, déviations angulaires, malformations des os carpaux et tarsaux, épiphysites, certaines affections dégénératives articulaires juvéniles, kystes osseux sous-chondraux et lésions d'OC (dont les lésions d'ostéochondrite disséquante, OCD) (Denoix et al, 2013). Le terme d'OC désigne une perturbation locale de l'ossification enchondrale des cartilages épiphysaires (§1.1.3.3.1) qui crée des zones de fragilité pouvant entraîner la libération de fragments osseux dans l'articulation, alors appelée OCD (van Weeren, 2005; Ytrehus et al, 2007; van der Heyden et al, 2008). La classification proposée par Denoix et ses collègues rassemble sous le terme d'OC les lésions et fragmentations radiographiquement visibles des surfaces articulaires et péri-articulaires et les kystes osseux sous-chondraux (Denoix et al, 2013).

#### 1.2.2.1.2. Pathogénie

L'OC a une pathogénie complexe, encore peu claire (Jeffcott et Henson, 1998; Ytrehus et al, 2007; Lecocq et al, 2008). La lésion initiale d'OC proviendrait d'une perturbation de la différenciation et/ou de la maturation des chondrocytes du cartilage épiphysaire. En histologie, cette lésion initiale est en effet caractérisée par la persistance des chondrocytes dans la zone d'hypertrophie et par un défaut de vascularisation. Les capillaires sanguins, qui devraient se développer sous l'action des facteurs de croissance VEGF et bFGF sécrétés par les chondrocytes différenciés, ne pénètrent pas la région distale des travées cartilagineuses et la maturation des chondrocytes échoue. En l'absence de maturation, ces derniers dégénèrent, conduisant à une non-calcification de la matrice extracellulaire. L'arrêt de l'ossification enchondrale entraîne la rétention du cartilage de croissance non-minéralisé qui devient plus épais et plus fragile (**Figure 22**) (Ytrehus et al, 2007).

Cette lésion initiale latente consiste en une zone focale de chondronécrose ischémique (Ytrehus et al, 2007). Elle se limite au cartilage de croissance sans s'étendre au cartilage articulaire ou à l'os enchondral et elle est invisible sur les radiographies. Elle est susceptible de régresser spontanément et complètement, ce qui fait de l'OC une affection dynamique qui ne se stabilise pas avant l'âge de 1 an (Dik et al, 1999; Jacquet et al, 2013). Si



**Figure 23.** Images radiographiques de lésions d'ostéochondrose disséquante dans un boulet antérieur (A), un jarret (B) et un grasset (C). A : vue latéro-médiale d'un boulet antérieur gauche avec un fragment d'ostéochondrose (flèche blanche) en regard de la partie dorso-proximale du tenon médian du métacarpien principal. B : vue oblique plantaro-latérale dorso-médiale d'un jarret avec un fragment d'ostéochondrose (flèche blanche) au niveau du relief intermédiaire de la cochlée tibiale. C : vue latéro-médiale d'un grasset avec une lésion d'ostéochondrose disséquante et plusieurs fragments d'ostéochondrose (têtes de flèche blanches) au niveau de la lèvre latérale de la trochlée fémorale (d'après van der Heyden et al, 2008).

elle ne cicatrise pas, elle évolue en lésion manifeste (sans fragment mais visible sur les radiographies) ou disséquante (OCD). La lésion d'OCD est le résultat d'une fissure dans le cartilage de croissance nécrosé qui s'étend au cartilage articulaire entraînant la formation d'un volet osseux ou une perte de substance avec formation d'un fragment libre dans l'articulation (**Figure 22**). Le fragment libre peut se résorber ou s'ossifier (« souris articulaire »). Le kyste osseux sous-chondral fait suite à des forces de compression appliquées à la surface articulaire causant une rétention du cartilage qui s'invagine dans l'os, puis se résorbe en laissant une lésion kystique focale. Cette lésion est visible sur les radiographies (Martin, 2013).

#### **1.2.2.1.3. Sites articulaires touchés**

Les lésions d'OC peuvent se développer en plusieurs sites chez le même animal (Sandgren et al, 1993; van der Heyden et al, 2008) et une lésion unique peut être à l'origine des signes cliniques (Ross et Dyson, 2003). Toutes les études sur la prévalence de l'OC s'intéressent aux lésions visibles sur les radiographies. Les articulations les plus fréquemment atteintes sont le boulet antérieur (prévalence de 6,1%, 9,9%, 14,1% et 21,5% selon les études et les races) (Sandgren et al, 1993; Denoix et al, 1997; van der Heyden et al, 2008; Vos, 2008), le boulet postérieur (prévalence de 8,6%, 13,4% et 37,5%) (Carton, 2004; Stock et al, 2005; Vos, 2008), le jarret (prévalence de 9,4%, 10,5%, 12,2% et 27,6%) et le grasset (prévalence de 9,8%, 14,8% et 20%) (Carton, 2004; van der Heyden et al, 2008; Vos, 2008) (**Figure 23**). Au sein de chaque articulation, les sites de prédilection de l'OC sont multiples. L'OC de la hanche, du coude et des cervicales existe aussi, mais l'exploration radiographique de ces régions est rarement réalisée pour des raisons de coût, de sécurité et de puissance des appareils : de ce fait, les données sont rares et l'inclusion de ces lésions dans le terme d'OC n'est pas usuelle (McIlwraith, 2002).

#### **1.2.2.1.4. Etiologie**

De nombreux facteurs étiologiques ont été invoqués pour cette affection. Tout d'abord, les tissus non ossifiés sont mis en pression dès la naissance lorsque le poulain se lève. Des forces biomécaniques s'exerçant sur des surfaces articulaires anormales pourraient causer des microtraumatismes répétés, entraînant un remodelage osseux plus important (Jackson et al, 2003; Crevier-Denoix et Denoix, 2005). D'autre part, une composante héréditaire a été démontrée, mais elle varie selon les races et les articulations étudiées. Enfin, les déséquilibres en minéraux tels que le calcium, le phosphore, le cuivre ou le zinc seraient des facteurs de risques. Le cuivre, notamment, est impliqué dans le processus d'ossification enchondrale, puisqu'il est cofacteur de la lysine oxydase, enzyme clef de l'assemblage du collagène. La carence en cuivre a ainsi souvent été invoquée dans l'étiologie de l'OC (Jeffcott et Henson, 1998; Ytrehus et al, 2007).

Les déséquilibres énergétiques de la ration du poulain, mais aussi de la mère sont également des facteurs de risque important. Le lien entre métabolisme énergétique et



développement des lésions d'OC sera développé au §1.2.3.3 et l'hypothèse d'une origine foétale de cette affection sera présentée au §1.3.3.4.

### **1.2.2.2. Poids de l'ostéochondrose sur la filière équine**

#### **1.2.2.2.1 Prévalence dans la population**

L'OC est fréquente chez le cheval, avec une prévalence variable selon les études. Ces dernières sont difficilement comparables car les articulations étudiées varient, mais aussi les méthodes de diagnostic, les critères radiographiques retenus, la provenance (ventes aux enchères, élevages), l'âge et la race des chevaux. La prévalence de l'OC est de 34,7 à 45% pour les Trotteurs Suédois et Français (Sandgren et al, 1993; Couroucé et al, 2001), de 31 à 34% pour les Demi-Sang néerlandais (Stock et al, 2005; Vos, 2008) et de 44% pour les poulains de sport de Wallonie (van der Heyden et al, 2008). Certaines races très peu atteintes ne sont l'objet que de rares études. Une seule étude rapporte des lésions d'OC dans le grasset chez 4 poneys hongres de 6 à 15 mois (Voute et al, 2011), une étude rapporte une prévalence de 5% d'OCD et de kystes osseux sous-chondraux chez 51 chevaux de trait mâles et femelles de 1 à 43 mois de différentes races (surtout des Clydesdale et des percherons) (Riley et al, 1998) et un cas de lésions cervicales d'OC est rapporté chez un cheval de trait belge hongre âgé de 14 mois (Muirhead et al, 2003).

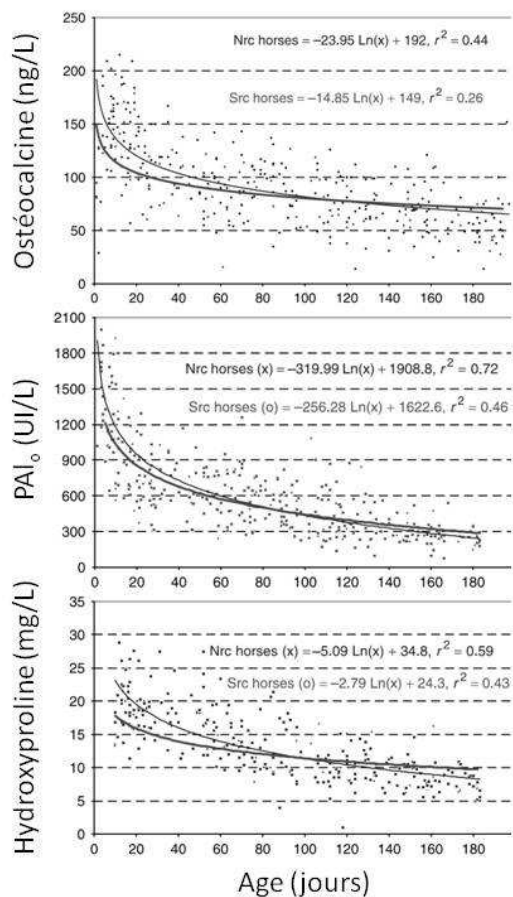
#### **1.2.2.2.2. Conséquence sur les performances sportives**

L'expression clinique de l'OC va de l'absence de symptôme à une boiterie sévère, en passant par l'effusion de synovie et le gonflement de l'articulation (Ross et Dyson, 2003). Susceptible de suspendre partiellement ou totalement la carrière sportive des sujets atteints, l'OC est une cause majeure de retraite prématurée, jeunes chevaux et chevaux plus âgés confondus (Rossdale et al, 1985; Wallin et al, 2000). C'est pourquoi le statut ostéoarticulaire des étalons est un critère de sélection dans la majorité des stud-books, bien que l'étiologie soit multifactorielle (§1.2.2.1.4).

Plusieurs études relient l'OC aux performances sportives du cheval. Pour le Trotteur Français, la détection radiographique de lésions à 2 ans n'est corrélée ni à la qualification, ni au nombre de départs ultérieurs en course, ni à l'indice de trot (logarithme du gain moyen par départ sur le gain moyen par départ des chevaux de la même catégorie d'âge et de sexe, calculé sur un an) jusqu'à 4 ans (Langlois et al, 2006). Mais parmi les chevaux à indice de trot faible, ceux présentant le moins de lésions réalisent des gains plus élevés et leur longévité en course est augmentée (Couroucé et al, 2001). De plus, les chevaux belges de saut d'obstacles atteints d'OC du grasset ou du tenon sagittal du troisième métatarse/carpe sortent moins en compétition et leurs performances sont plus faibles que ceux sans lésion ou avec des lésions en d'autres sites (Verwilghen et al, 2013).

		71 poulains sains + 45 poulains atteints					262 poulains sains et atteints	
		10 jours	1 <sup>er</sup> mois	2 <sup>ème</sup> mois	3 <sup>ème</sup> mois	4 <sup>ème</sup> - 6 <sup>ème</sup> mois	7 <sup>ème</sup> - 12 <sup>ème</sup> mois	13 <sup>ème</sup> - 18 <sup>ème</sup> mois
Ostéocalcine (ng/mL)	Sains	124,5 ±42,8	124,7 ±26,9	106,2 ±24,0	99,4 ±25,7	67,2 ±25,7	38,5 ±12,4	32,7 ±9,8
	Atteints	126,6 ±52,1	126,4 ±32,4	97,7 ±23,1	96,2 ±14,6	78,3 ±21,3		
Isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline (UI/L)	Sains	1453 ±599	690 ±299	592 ±189	468 ±147	319 ±132	227 ±103	158 ±56
	Atteints	1171 ±677	756 ±369	713 ±428	524 ±138	331 ±170		
Hydroxyproline (mg/L)	Sains	16,7 ±3,3	16,8 ±3,5	14,0 ±3,4	10,9 ±2,8	7,6 ±2,2	5,5 ±1,2	4,4 ±1,5
	Atteints	14,3 ±3,6	16,7 ±3,2	14,9 ±1,6	12,4 ±2,0	9,3 ±3,1		

**Tableau 6.** Concentrations sériques (moyennes ± écarts-types) en ostéocalcine, isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline et hydroxyproline de la naissance à 6 mois chez 116 poulains sans lésion articulaire (sains) ou avec des lésions articulaires sévères (atteints) et de 7 à 18 mois chez 262 poulains sains et atteints. L'examen radiographique est réalisé à 18 mois. Les poulains sont des Pur-Sang, des Trotteurs français et des Selles français (d'après Valette et al, 2007).



**Figure 24.** Variations de la concentration sérique en ostéocalcine, en isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline (PAL<sub>o</sub>) et en hydroxyproline en fonction de l'âge et du statut ostéoarticulaire. Ligne fine : régression chez les poulains sans lésion articulaire à 18 mois. Ligne épaisse : régression chez les poulains avec des lésions articulaires sévères à 18 mois (d'après Valette et al, 2007).

Ainsi, outre ses conséquences sur le bien-être du cheval, l'OC est à l'origine de lourdes pertes économiques pour la filière équine internationale (Jeffcott et Henson, 1998). Celles-ci sont imputables aux frais vétérinaires (des traitements existent, mais ils ne sont pas toujours abordables financièrement et parfois insuffisants) et au manque à gagner en termes d'argent et de temps investis dans l'entraînement en vue d'une carrière sportive et en termes de non-réalisation de gains éventuels en compétition (Martin, 2013).

### **1.2.2.3. Diagnostic de l'ostéochondrose chez l'équin**

Lors des visites d'achat, les vétérinaires cherchent d'éventuelles lésions d'OC avant leur expression clinique. Cet examen peut orienter vers une suspicion, mais est souvent insuffisant pour établir un diagnostic précoce avec certitude. La radiographie reste la technique la plus utilisée du fait de son coût modéré, mais elle est peu sensible. L'échographie, l'arthroscopie ou la résonance magnétique ont une meilleure sensibilité, mais sont plus coûteuses, donc rarement utilisées en pratique vétérinaire courante (Lepeule, 2007; Martin, 2013). Mais la prévalence des lésions d'OC est associée à des variations anaboliques du métabolisme osseux. Quatre marqueurs biochimiques des phénomènes de formation/résorption osseuse et/ou relatifs à la croissance sont présentés ici : ils pourraient permettre d'identifier les stades précoces de l'OC et seraient faciles à utiliser sur le terrain *via* le prélèvement de sang.

#### **1.2.2.3.1. Ostéocalcine**

L'ostéocalcine représente 25% des protéines non-collagéniques de la matrice osseuse (Lepage et al, 1990). Elle est presque exclusivement sécrétée par les ostéoblastes matures sous l'action du calcitriol (forme active de la vitamine D) (Beresford et al, 1984; Camarda et al, 1987). La carboxylation des trois acides  $\alpha$ -carboxy-glutamiques de la pro-ostéocalcine dépend de la vitamine K et du CO<sub>2</sub> et est indispensable à la sécrétion de l'ostéocalcine. Ces résidus permettent la liaison de la protéine au calcium, ce qui provoque un changement de conformation de la molécule lui permettant de se lier à l'hydroxyapatite (composant de la matrice extracellulaire de l'os). La synthèse d'ostéocalcine est stimulée par l'IGF-I et par la T<sub>3</sub> et inhibée par les glucocorticoïdes (Chenu et al, 1990; Lepage et al, 1990; Gouveia et al, 2001). La majeure partie de l'ostéocalcine est intégrée à l'os, mais 10 à 40% sont relargués dans la circulation. Elle reflète ainsi l'activité ostéoblastique, ce qui en fait un marqueur sensible de la formation osseuse, notamment chez le cheval (Lepage et Marcoux, 1991; Davicco et al, 1994).

Chez le poulain, l'ostéocalcine suit un rythme nyctéméral (70% des pics ont lieu la nuit) (Lepage et al, 1991) et un rythme saisonnier. En effet, elle diminue fortement en novembre et augmente en décembre et janvier (Maenpaa et al, 1988). Après une augmentation jusqu'au dixième jour après la naissance, la concentration sanguine en ostéocalcine diminue progressivement pendant les 30 premiers mois (**Tableau 6 et**





**Figure 24)** (Lepage et al, 1990; Davicco et al, 1994; Frisbie et al, 2008). Sa concentration synoviale augmente en cours d'exercice. Chez le poulain Selle Hollandais, la concentration sanguine en ostéocalcine est fortement corrélée à la sévérité des lésions d'OC, positivement à 5 mois et négativement à 11 mois (Billinghurst et al, 2004). Chez le poulain Selle Français, la concentration sanguine en ostéocalcine à 2 semaines est corrélée au nombre de lésions d'OC à 5,5 mois et à 11 mois (Donabedian et al, 2008). Enfin, dans un groupe de poulains de races Pur-Sang, Trotteur Français et Selle Français, il a été montré que la concentration sanguine en ostéocalcine pendant les 6 premiers mois après la naissance est plus élevée chez les animaux présentant des images radiographiques normales à 18 mois que chez ceux présentant de sévères lésions articulaires (Valette et al, 2007). Ces données sont paradoxales, mais difficiles à comparer car les races et le type d'analyses varient d'une étude à l'autre.

#### **1.2.2.3.2. Isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline**

Les phosphatases alcalines sont des enzymes associées aux membranes cellulaires et libérées par la synthèse et la lyse de ces membranes. Quatre isoenzymes, issues de l'os, du foie, de l'intestin et des reins, sont présentes dans la circulation sanguine (Froscher et Nagode, 1979; Christenson, 1997). Un seul gène code les isoenzymes hépatique et osseuse (qui ne diffèrent que par une glycosylation post-traductionnelle) et un seul gène code les isoenzymes intestinale et rénale (Hank et al, 1993). L'activité sanguine des phosphatases alcalines totales ( $PAL_{tot}$ ) est liée surtout aux isoenzymes hépatique ( $PAL_h$ ) et osseuse ( $PAL_o$ ). Elle augmente rapidement à la naissance, puis diminue pendant les premières semaines après la naissance, indépendamment des quantités de  $PAL_{tot}$  dans le colostrum et le lait (Hank et al, 1993; Christenson, 1997; Price et al, 2001). La concentration sanguine en  $PAL_{tot}$  suit un rythme journalier, avec un minimum entre 14 et 20 heures et un maximum entre 5 et 16 heures (Lepage et al, 1991) et un rythme saisonnier, puisqu'elle augmente progressivement en décembre et janvier (Maenpaa et al, 1988). L'activité des  $PAL_{tot}$  suit aussi un rythme saisonnier, puisqu'elle diminue de 40% en novembre pendant le premier automne des poulains (rentrée au box). Enfin, la concentration sanguine en  $PAL_o$  est corrélée aux concentrations sanguines en ostéocalcine, en  $T_3$  et en  $T_4$  (Smeets et van Buul-Offers, 1986; Maenpaa et al, 1988; Lepage et al, 1991; Ohlsson et al, 1992a). La  $PAL_o$  est inhibée par l'IGF-I (Ohlsson et al, 1992a; Magnusson et al, 1997).

La concentration sanguine  $PAL_o$  représente 92% de la concentration sanguine en  $PAL_{tot}$  chez le poulain nouveau-né, 60% chez les chevaux de moins de 1 an et 20% après 5 ans, tandis que l'activité de la  $PAL_h$  est la même chez le poulain et le cheval adulte (Hank et al, 1993; Price et al, 1995). La concentration sanguine en  $PAL_o$  reflète donc la croissance osseuse du poulain. La concentration sanguine en  $PAL_o$  est élevée chez le très jeune poulain (**Tableau 6 et Figure 24**) (Hank et al, 1993; Price et al, 2001; Valette et al, 2007), elle diminue mais reste élevée pendant les 6-8 premiers mois, puis diminue progressivement au-delà de 1 an (Price et al, 2001; Jackson et al, 2003). La  $PAL_o$  est produite par les ostéoblastes et les



chondrocytes et elle est surtout relarguée au niveau de la plaque de croissance, site de minéralisation importante (Henson et al, 1995; Christenson, 1997; Pagani et al, 2005). Les dépôts ainsi formés joueraient un rôle essentiel à la formation osseuse car la PAL<sub>o</sub> dégrade les pyrophosphates, inhibiteurs du dépôt phosphocalcique extracellulaire (Bouman et al, 1995; Christenson, 1997). Peu de données relient la concentration sanguine en PAL<sub>o</sub> à la présence ou à la sévérité des lésions d'OC chez le cheval. Dans un groupe de poulains de races Pur-Sang, Trotteur Français et Selle Français, la concentration sanguine en PAL<sub>o</sub> est plus élevée pendant les 6 premiers mois chez les animaux présentant des images radiographiques normales à 18 mois que chez ceux présentant de sévères lésions articulaires (Valette et al, 2007). Chez le porc, l'activité de la PAL<sub>o</sub> est diminuée dans les chondrocytes hypertrophiques près des lésions d'OC (Ekman et Rodriguez-Martinez, 1991), ce qui pourrait être cohérent avec l'observation précédente.

#### **1.2.2.3.3. Hydroxyproline**

L'hydroxyproline représente 13% des acides aminés contenus dans le collagène. Libérée lors de la dégradation de la matrice osseuse, l'hydroxyproline n'est pas recyclée, ce qui en fait un bon marqueur de la résorption osseuse, mesurable dans l'urine (80-90% de l'hydroxyproline libre), le liquide synovial et le sang. Chez le cheval, sa concentration sanguine diminue avec l'âge (**Tableau 6 et Figure 24**) (Yamamoto, 1981; Valette et al, 2007). La concentration synoviale est élevée chez le nouveau-né et diminue en cours de croissance (van den Boom et al, 2004), mais au-delà de 4 ans, les concentrations synoviales en collagène et hydroxyproline ne varient plus (Brama et al, 1999; van den Boom et al, 2004). Chez le Trotteur, même si la concentration synoviale en hydroxyproline est la même dans les articulations atteintes d'ostéoarthrite et les articulations saines du cheval adulte, elle semble être corrélée positivement à l'indice de dégénérescence du cartilage (un indice de la sévérité de l'ostéoarthrite dans l'articulation basé sur la quantification du nombre de pixels dans les images numériques des cartilages colorés) et à l'activité des métalloprotéinases matricielles (van den Boom et al, 2004). D'autre part, dans un groupe de poulains de races Pur-Sang, Trotteur Français et Selle Français, il a été montré que la concentration sanguine en hydroxyproline est plus élevée pendant les 6 premiers mois chez les animaux présentant des images radiographiques normales à 18 mois que chez ceux présentant de sévères lésions articulaires (Valette et al, 2007).

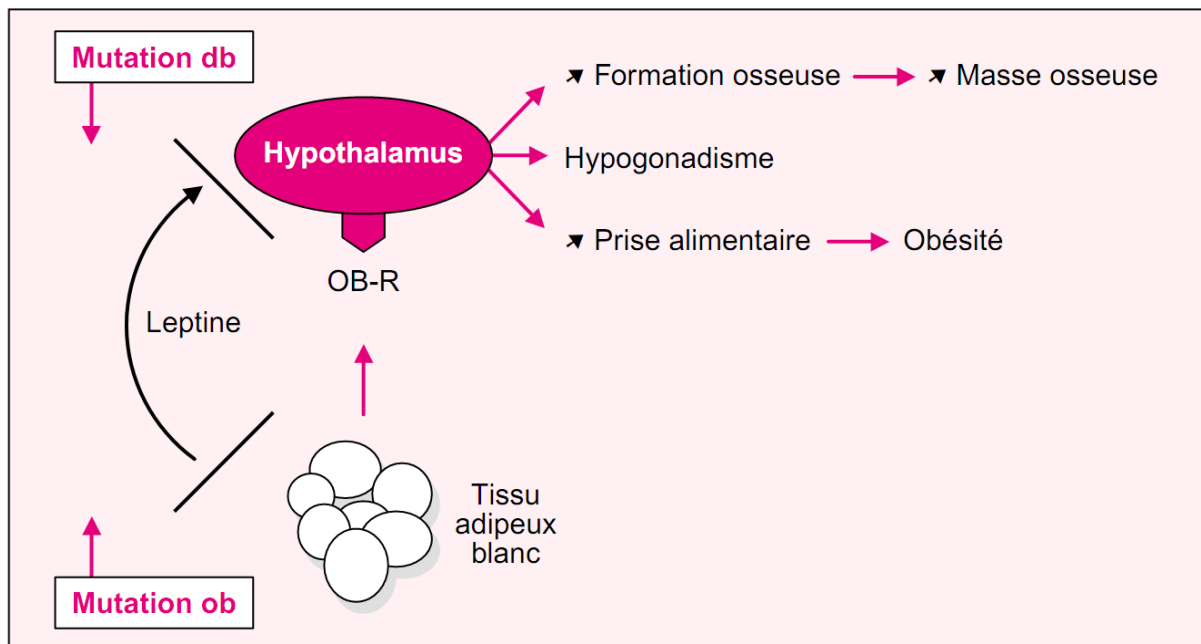
#### **1.2.2.3.4. Carboxy-télopeptide du collagène de type II**

Le collagène de type II, synthétisé par les chondrocytes, est le principal composant de la matrice extracellulaire du cartilage. Il représente 95% du collagène total du cartilage articulaire et est essentiel à la résistance du tissu (Mayne, 1989; Kuettner, 1992). La dégradation de sa triple hélice produit le carboxy-télopeptide du collagène de type II (CTX-II). Le CTX-II est un bon marqueur de la sévérité et de l'évolution de la dégradation du cartilage chez l'Homme (Garnero et al, 2008).

Age	CTX-II (pg/mL)
5-6 ans	71,4 (8,6)
7-13 ans	23,9 (6,1)
14-19 ans	49,5 (6,7)
20-23 ans	41,2 (8,6)

Boiterie	CTX-II (pg/mL)
Absence	69,8 (7,9)
Faible	51,4 (6,3)
Modérée	28,9 (6,0)
Sévère	23,2 (8,6)

**Tableau 7.** Concentration synoviale (moyennes et écart-type) en CTX-II en fonction de l'âge d'une part et de la sévérité de la boiterie d'autre part, chez des chevaux de races American Saddlebred, Pur-Sang, Quarter Horse, Arabe, American Paint Horse (d'après Fyfe, 2012).



**Figure 25.** Conséquences de la mutation ob/ob (absence de sécrétion de leptine) et de la mutation db/db (absence de signal leptinique). Ces mutations entraînent une augmentation de la prise alimentaire, un hypogonadisme et une augmentation de la masse osseuse (Karsenty, 2001).

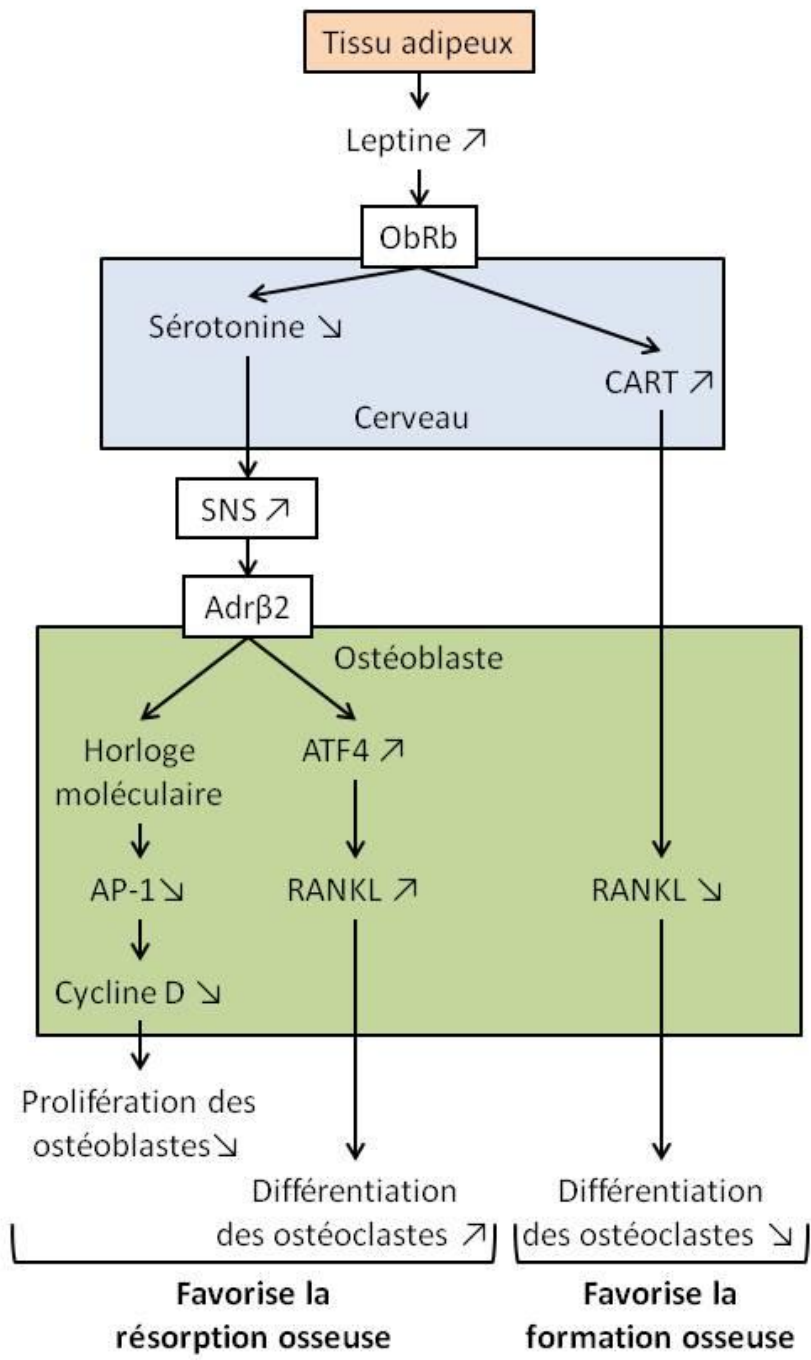
Dans un groupe de races variées (American Saddlebred, Pur-Sang, Quarter Horse, Arabe et American Paint Horse), la concentration synoviale en CTX-II est plus élevée chez les jeunes chevaux en fin croissance (5 à 6 ans), elle diminue entre 7 et 13 ans, puis réaugmente chez les chevaux plus âgés (14 à 23 ans) sans pour autant atteindre le niveau des jeunes chevaux (**Tableau 7**). Dans ce même groupe, elle est plus élevée chez les juments que chez les hongres et diminue quand la sévérité de la boiterie augmente (**Tableau 7**) (Fyfe, 2012). Chez le Pur-Sang, la concentration synoviale en CTX-II est un bon indicateur de la présence de lésions d'OC dans les articulations du carpe, dans lesquelles elle augmente (Trumble et al, 2009; Cleary et al, 2010). Enfin, chez le Pur-Sang, la concentration sanguine en CTX-II serait aussi significativement affectée en présence de blessures du carpe provoquant une boiterie (Mack et al, 2007). *Pour revue (Fyfe, 2012).*

### 1.2.3. Dialogue entre les métabolismes énergétique et osseux

#### 1.2.3.1. Hypothèse d'une co-régulation des métabolismes énergétique et osseux

Chez les vertébrés, à partir de la fin de la croissance, la masse osseuse est maintenue par un processus physiologique complexe et dynamique appelé remodelage osseux. Il répare les micro- et macro-lésions du squelette (Karsenty, 1999). Cette fonction homéostatique consiste en la succession de deux évènements cellulaires : la résorption de la matrice osseuse minéralisée par les ostéoclastes, puis la formation de l'os *de novo* par les ostéoblastes. Le coût énergétique quotidien de la destruction osseuse associé au coût énergétique quotidien de la formation osseuse, simultanément en différents sites du squelette, est un premier argument en faveur d'une co-régulation des métabolismes énergétique et osseux (Clement et Karsenty, 2005; Karsenty et Oury, 2010).

Avec 200 millions de femmes atteintes dans le monde, la perturbation la plus fréquente du remodelage osseux est l'ostéoporose (IOF, 2014), caractérisée par une augmentation relative de la résorption osseuse par rapport à la formation osseuse causant un risque accru de fracture (Dennison et al, 2005a). Cette perte osseuse est liée à l'arrêt des fonctions gonadiques. L'obésité prévient cette perte osseuse, même après la ménopause (Karsenty, 2001). *A contrario*, l'anorexie augmente le risque de fracture (Faje et al, 2014). Ces observations cliniques sont un second argument en faveur d'une régulation hormonale commune de la masse osseuse, du poids corporel et de la fonction de reproduction (Karsenty, 2001). La leptine, sécrétée majoritairement par les adipocytes et jouant un rôle dans la régulation de la prise alimentaire et de la fonction de reproduction (§1.2.1.3.2), semble être un agent essentiel dans le dialogue entre le métabolisme énergétique et le métabolisme osseux. En effet, les souris *ob/ob* déficientes en leptine, ou *db/db* sans récepteur fonctionnel de la leptine, sont non seulement hypogonadiques (Strobel et al, 1998) et obèses, mais ont aussi une masse osseuse augmentée, pour l'ensemble des os du squelette (**Figure 25**) (Ducy et al, 2000). Ces troubles de la masse osseuse ne sont pas une



**Figure 26.** Contrôle de la résorption et de la formation osseuse par la leptine. ObRb : récepteur de la leptine, CART : cocaine and amphetamine-regulated transcript, SNS : système nerveux sympathique, Adrβ2 : récepteur adrénergique β2, AP-1 : activator protein 1, ATF4 : activating transcription factor 4, RANKL : receptor activator of NF-κB ligand (d'après Wei et Ducy, 2010).

conséquence directe de l'obésité puisque les souris *ob/ob* soumises à un régime pauvre en graisses dès la naissance conservent un poids corporel normal avec un phénotype de masse osseuse élevée. De plus, ce phénotype est absent chez les souris Agouti obèses et chez les souris sauvages soumises à un régime enrichi en graisses et en glucides pour induire une obésité. L'ensemble de ces éléments suggère l'existence d'une stimulation directe de la masse osseuse par la leptine (Karsenty, 2001).

Enfin, chez les vertébrés, l'apparition de la leptine au cours de l'évolution est concomitante à l'apparition des cellules osseuses et non à celle des adipocytes, de l'appétit ou de la reproduction. Ce dernier argument est aussi en faveur d'un rôle endocrine de la leptine dans le contrôle du remodelage osseux et du métabolisme énergétique (Doyon et al, 2001; Huisling et al, 2006).

### 1.2.3.2. Mécanismes de co-régulation des métabolismes énergétique et osseux

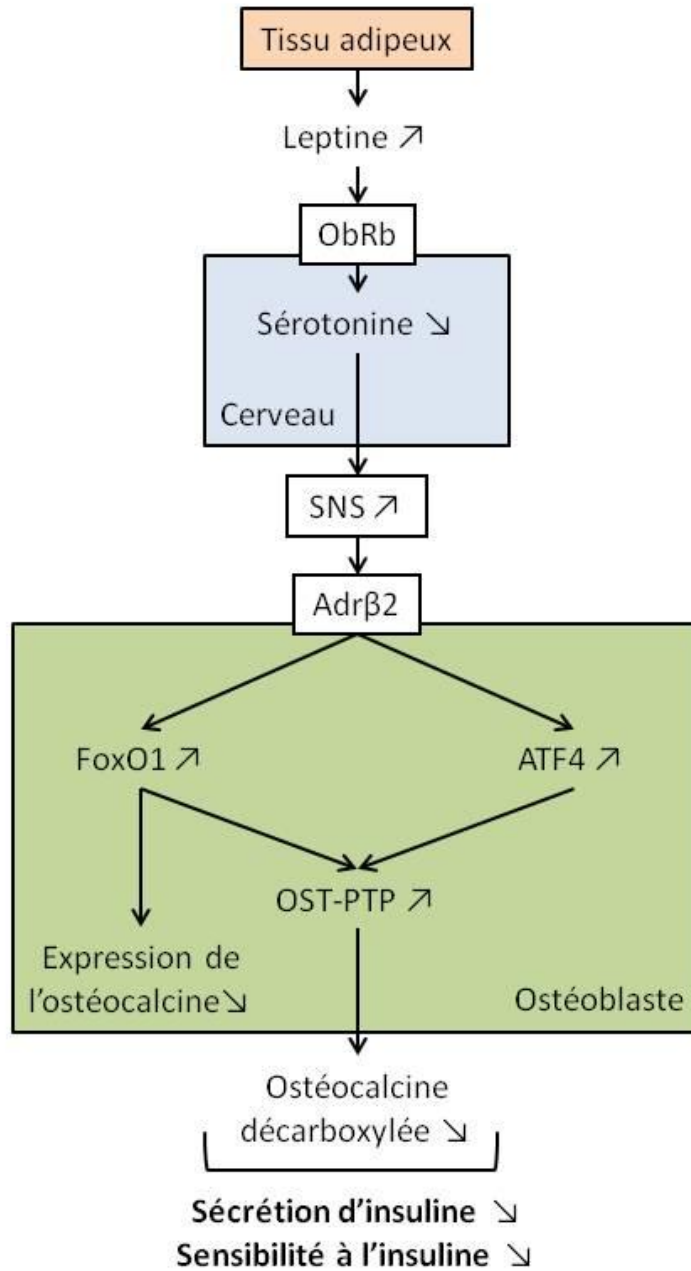
L'hypothèse formulée ci-dessus fait l'objet de beaucoup d'intérêt. Même si les mécanismes sous-jacents à la co-régulation des métabolismes du tissu adipeux et du tissu osseux ne sont pas encore complètement élucidés, les modèles murins transgéniques ont déjà fournis de nombreux éléments de réponse.

#### 1.2.3.2.1. Régulation du remodelage osseux par le tissu adipeux

La leptine, en se fixant à son récepteur ObRb sur les neurones sérotoninergiques du tronc cérébral, réduit la synthèse de sérotonine, entraîne une augmentation du tonus sympathique (Wei et Ducey, 2010) et favorise ainsi indirectement la résorption osseuse (Yadav et al, 2009). Cette augmentation du tonus sympathique stimule le récepteur adrénergique  $\beta 2$  (ADR $\beta 2$ ) sur les ostéoblastes (Takeda et al, 2002). D'une part, la prolifération ostéoblastique est inhibée (*via* l'horloge moléculaire qui inhibe l'expression des gènes AP-1 (*activator protein 1*) et des cyclines de type D) (Wei et Ducey, 2010) et d'autre part, l'expression de RANKL (*receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*) dans les ostéoblastes est favorisée, RANKL étant le principal facteur de différenciation des ostéoclastes (*via* la phosphorylation d'ATF4, *activating transcription factor 4*) (**Figure 26**) (Clement et Karsenty, 2005). C'est pourquoi les souris *ADR $\beta 2$ <sup>-/-</sup>* (invalidation du gène ADR $\beta 2$ ) ont une formation osseuse augmentée et sont protégées de la perte osseuse après ovariectomie (Elefteriou et al, 2005). Pourtant, les souris *ob/ob* déficientes en leptine ont une masse osseuse et une résorption osseuse augmentées, un tonus sympathique bas, tout en étant hypogonadiques (Clement et Karsenty, 2005).

Cet apparent paradoxe s'explique par le fait que la leptine favorise aussi indirectement la formation osseuse *via* la régulation de l'expression du gène *CART* (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*). Ce gène code un neuropeptide impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Ce facteur est





**Figure 27.** Contrôle de l'homéostasie glucidique par l'ostéoblaste *via* l'ostéocalcine et contrôle de l'ostéocalcine par la leptine. ObRb : récepteur de la leptine, SNS : système nerveux sympathique, Adrβ2 : récepteur adrénergique β2, FoxO1 : *forkhead box protein O1*, ATF4 : activating transcription factor 4, OST-PTP : *osteotesticular-protein tyrosine phosphatase* (d'après Wei et Ducy, 2010).

principalement exprimé dans l'hypothalamus (Eleftheriou et al, 2005). Ainsi, les souris *ob/ob* se distinguent des souris *ADR62<sup>-/-</sup>* par une diminution de l'expression hypothalamique de *CART* (Kristensen et al, 1998) et par une augmentation de la résorption osseuse (Driessler et Baldock, 2010). En effet, *CART* favorise la résorption osseuse en inhibant l'expression de *RANKL* dans les ostéoblastes et donc la différenciation des ostéoclastes (**Figure 26**) (Wei et Ducy, 2010).

#### **1.2.3.2.2. Régulation de l'homéostasie glucidique par le tissu osseux**

Les modèles murins transgéniques développés pour l'étude des mécanismes de co-régulation des métabolismes énergétique et osseux ont aussi montré que le squelette est un organe endocrine (Lee et al, 2007; Lee et Karsenty, 2008). En effet, les ostéoblastes sécrètent une hormone, l'ostéocalcine, sous la forme d'une pré-pro-protéine dont trois acides glutamiques sont  $\gamma$ -carboxylés (résidus Gla) avant qu'elle soit sécrétée dans le microenvironnement osseux et dans la circulation générale (§1.2.2.3.1) (Wei et Ducy, 2010). Une petite fraction d'ostéocalcine décarboxylée (bioactive) est sécrétée dans la circulation générale et stimule la prolifération des cellules  $\beta$  du pancréas, l'expression des gènes codant l'insuline dans ces cellules  $\beta$  du pancréas et des gènes codant l'adiponectine dans les adipocytes (Wei et al, 2014). L'augmentation de la sécrétion d'insuline, concomitante à l'augmentation de la sécrétion d'adiponectine qui améliore la sensibilité à l'insuline des tissus cibles, améliore la prise en charge du glucose dans l'organisme (Lee et Karsenty, 2008).

L'activité de l'ostéocalcine est elle aussi sous le contrôle de la leptine et du système nerveux sympathique. Le signal sympathique, *via* la phosphorylation d'ATF4 et *via* l'expression du facteur de transcription FoxO1 (*forkhead box protein O1*), augmente l'expression de la tyrosine kinase OST-PTP (*osteotesticular-protein tyrosine phosphatase*) responsable de la carboxylation de l'ostéocalcine. FoxO1 diminue aussi directement l'expression de l'ostéocalcine. Le signal sympathique diminue donc le niveau d'ostéocalcine décarboxylée et ainsi ses effets sur la sécrétion d'insuline et la sensibilité à l'insuline (**Figure 27**) (Rached et al, 2010; Wei et Ducy, 2010).

#### **1.2.3.3. Ostéochondrose et perturbations du métabolisme énergétique**

La prévalence de l'OC est beaucoup plus faible dans les troupes de chevaux sauvages (environ 6%) que chez les chevaux domestiques (Valentino et al, 1999), suggérant un rôle des conditions modernes d'élevage dans le développement des lésions. Les rations du poulain riches en céréales (*i.e.* riches en amidon et autres glucides non-structuraux) sont citées de façon récurrente comme une origine potentielle des lésions d'OC (Glade et Belling, 1986; Lewis, 1996). Les concentrés causent en effet une augmentation postprandiale de la glycémie stimulant la sécrétion d'insuline (Glade et al, 1984), impliquée dans la régulation des métabolismes osseux et cartilagineux *via* la GH et l'IGF-I. Une étude *in vitro* montre en particulier que l'insuline permet la survie des chondrocytes équins (Henson et al, 1997). De



cette façon, elle inhiberait la maturation des chondrocytes, ralentissant la formation osseuse. D'autre part, l'augmentation postprandiale de l'insulinémie accélérerait la conversion de  $T_4$  en  $T_3$  et diminuerait la concentration sanguine en  $T_4$ , essentielle à la maturation du cartilage et à la formation osseuse (§1.1.3.3.2) (Glade et Reimers, 1985).

Dans une étude prospective impliquant 24 animaux, 12 poulains sur 12 recevant 129% des apports énergétiques recommandés par le NRC (*National Research Council*) pendant 4-5 mois ont développé des lésions d'OC (observations histologiques) contre seulement 2 poulains sur 12 recevant 100% des apports énergétiques et protéiques recommandés par le NRC (Savage et al, 1993). D'autre part, la plaque de croissance de poulains Pur-Sang recevant 130% des apports énergétiques et protéiques recommandés par le NRC pendant 8 mois était plus épaisse que celle des poulains recevant 70% des apports énergétiques et protéiques recommandés (Glade et Belling, 1984). L'organisation du cartilage de ces poulains sur-nourris était typique des articulations affectées par l'OC, avec des zones de repos et d'hypertrophie surdéveloppées, sans capillaire sanguin et sans organisation en colonnes des chondrocytes (Glade et Belling, 1984). De plus, Ralston et ses collègues ont observé des variations postprandiales de la glycémie et de l'insulinémie de plus grande amplitude chez 4 poulains atteints d'OCD (parmi 15 poulains suivis) recevant une ration riche en céréales deux fois par jour (Ralston, 1996). Enfin, une étude épidémiologique a montré que l'insulinémie postprandiale était deux fois plus élevée chez les poulains atteints d'OC que chez les poulains sains (Pagan et al, 2001). En outre, plus la réponse insulínique au repas était forte, plus les lésions étaient nombreuses (Pagan et al, 2001). Cependant, aucune de ces études ne fournit d'information détaillée sur la prise alimentaire des animaux, leur état corporel ou la composition minérale des régimes, autant de facteurs susceptibles de moduler les réponses glycémique et insulínique postprandiales.

L'augmentation des apports énergétiques ne suffit pas toujours à expliquer l'apparition d'AOAJ. L'étude de Donabedian et ses collègues incrimine plutôt la vitesse de croissance des poulains, indépendamment du niveau énergétique de la ration (Donabedian et al, 2006). Ces données sont étayées par l'étude de van Weeren et ses collègues qui a montré que les poulains atteints d'OC fémoro-patellaire avaient un gain de poids supérieurs aux poulains sains à 3 et 5 mois, avec une plus grande hauteur au garrot (van Weeren et al, 1999). Le fait que le cheval soit un animal à croissance rapide, particulièrement dans la période où les AOAJ se développent, est en faveur d'un effet de la vitesse de croissance sur le développement de l'OC.



## En résumé

**Le cheval est sujet à des pathologies métaboliques impliquant des perturbations de la sensibilité à l'insuline, aujourd'hui rassemblées sous le nom de syndrome métabolique équin, mais aussi à des perturbations du développement osseux telles que l'ostéochondrose. Leur prévalence au sein de la population est élevée et a de lourdes conséquences économiques sur la filière équine sportive.**

**Le métabolisme énergétique (représenté par les adipocytes et les cellules  $\beta$  du pancréas) et le métabolisme osseux (représenté par les ostéoblastes) se régulent mutuellement selon des mécanismes déjà bien décrits. La leptine, l'ostéocalcine et l'insuline en sont les acteurs centraux.**

**Cette étroite relation entre le tissu osseux et le statut énergétique de l'individu est vérifiée pour les poulains atteints d'ostéochondrose chez qui la prévalence des lésions a été reliée à des anomalies de la réponse insulinaire postprandiale**

<b>Système physiologique</b>	<b>Pathologies</b>
Système cardiovasculaire	Hypertension
	Coronaropathie
	Accident vasculaire cérébral
	Athérosclérose
	Troubles de la coagulation
Pré-éclampsie	
Système métabolique	Altérations de la tolérance au glucose
	Insulinorésistance
	Dyslipidémie
	Obésité
Diabète de type II	
Système reproducteur	Syndrome des ovaires polykystiques
	Puberté précoce
	Ménopause précoce
Système respiratoire	Maladie pulmonaire obstructive chronique
	Asthme
Système endocrine	Hypercorticisme
	Hypothyroïdie
Système nerveux	Troubles neurologiques
	Schizophrénie
	Démence
Système squelettique	Ostéoporose

**Tableau 8.** Pathologies de l'adulte associées à un développement intra-utérin suboptimal chez l'Homme (d'après une méta-analyse de Fowden et al, 2006).

<b>Indice de masse corporelle (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Poids de naissance (g)</b>	<b>Prévalence Intervalle de confiance à 68%</b>
1 <sup>er</sup> tiers	< 2 500	35,4 (23,2 - 49,9)
	2 500 - 3 499	13,0 (10,7 - 15,7)
	3 500 - 4499	12,2 (9,3 - 15,8)
	≥ 4 500	52,4 (36,1 - 68,2)
2 <sup>nd</sup> tiers	< 2 500	35,6 (23,0 - 50,6)
	2 500 - 3 499	18,6 (16,0 - 21,5)
	3 500 - 4 499	21,4 (17,8 - 25,6)
	> 4 500	22,7 (8,8 - 47,0)
3 <sup>ème</sup> tiers	< 2 500	32,6 (19,5 - 49,5)
	2 500 - 3 499	25,8 (22,5 - 29,3)
	3 500 - 4 499	23,4 (20,1 - 27,1)
	≥ 4 500	36,0 (23,8 - 50,2)

**Tableau 9.** Prévalence du diabète selon le poids de naissance et l'indice de masse corporelle dans une population de 1 179 indiens pimas (d'après McCance et al, 1994).

## 1.3. Origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte chez l'équin

### 1.3.1. Concepts d'origines fœtales de la santé

L'objet de cette partie n'est pas de faire une synthèse exhaustive des nombreux travaux publiés dans ce domaine. En effet, le terme de « *fetal programming* » dans un moteur de recherche tel que PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) renvoie aujourd'hui plus de 135 000 résultats. Il s'agit plutôt de présenter les principes généraux en s'appuyant sur quelques exemples issus de la littérature.

#### 1.3.1.1. Hypothèse d'une programmation fœtale chez l'Homme et l'animal

McCance fut l'un des premiers à utiliser la notion de « périodes critiques », de la conception à la puberté, déterminant la trajectoire de croissance de l'individu (McCance, 1976). Plus tard, les observations épidémiologiques de Barker et Hales ont plus précisément relié les événements précoces du développement à un ensemble de pathologies de l'adulte (**Tableau 8**). En effet, la cohorte du Hertfordshire (16 000 hommes et femmes nés entre 1911 et 1931 et suivis jusqu'à aujourd'hui) a fait l'objet d'une étude pionnière démontrant que les patients de petit poids de naissance (reflet d'un développement fœtal suboptimal) avaient un risque accru de développer une insuffisance coronarienne, une hypertension ou un diabète de type II à l'âge adulte (Barker et al, 1989; Barker et al, 1993a; Barker et al, 1993b). Ce phénomène a d'abord été connu sous le nom de « programmation fœtale » ou « hypothèse de Barker » (Barker, 1990).

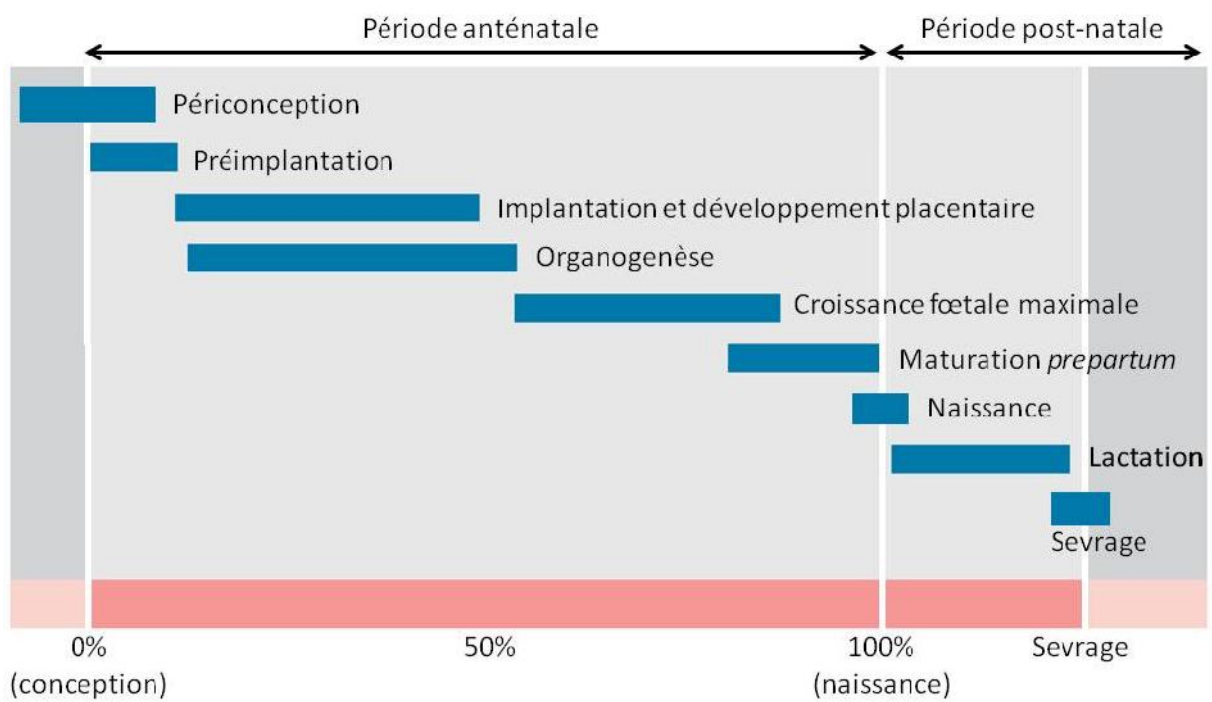
Il est aujourd'hui admis que ce ne sont pas seulement les individus avec un petit poids de naissance (inférieur à 2,5 kg) qui présentent un risque accru de développer des pathologies métaboliques, mais aussi ceux avec un poids de naissance excessif (supérieur à 4 kg). Ainsi, l'évolution du risque de développer ces pathologies en fonction du poids de naissance suit une courbe « en U » (**Tableau 9**) (McCance et al, 1994; Curhan et al, 1996). La tribu pima fournit un bon exemple de cette évolution caractéristique de la prédisposition des individus aux désordres métaboliques en fonction de leur poids de naissance. Chez les indiens pimas, fortement prédisposés au diabète de type II (sur 1 600 sujets, 40% des pères et 50% des mères sont diabétiques), les enfants issus de pères diabétiques sont diabétiques, mais aussi plus légers à la naissance. Dans ce cas, ce sont les gènes de prédisposition au diabète hérités du père qui affectent la croissance fœtale *via* l'insuline. *A contrario*, les enfants nés de mères diabétiques sont diabétiques, mais aussi plus lourds à la naissance. Dans ce cas, c'est l'environnement intra-utérin hyperglycémique qui est mis en cause. La prédisposition au diabète est donc accrue chez les petits bébés et les gros bébés (Bennett et al, 1971; Lindsay et al, 2000; Frayling et Hattersley, 2001).





L'étude des individus exposés *in utero* à la famine hollandaise de 1944, prédisposés à l'obésité, l'intolérance au glucose, l'hypertension ou aux pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte, a ensuite permis de démontrer l'importance de la nutrition maternelle dans cette programmation (Ravelli et al, 1998; Ravelli et al, 1999; Roseboom et al, 2001). Ainsi, en conditions défavorables telle que la sous-nutrition maternelle, le fœtus mettrait en place des adaptations physiologiques (comme une diminution de la sensibilité à l'insuline par exemple) pour assurer sa survie immédiate. C'est la notion de « *thrifty phenotype* » ou « phénotype économe » (Hales et Barker, 1992; Hales et al, 1997; Hales et Barker, 2001). Ces adaptations donneraient un avantage métabolique à l'individu en prévision d'un environnement post-natal hypothétiquement carencé. C'est la notion de « *predictive adaptive response* » ou « réponse adaptative prédictive » (Gluckman et Hanson, 2004). Cependant, si l'environnement n'est pas carencé voire en cas de surnutrition dans la période post-natale, l'individu serait mal adapté et présenterait un risque accru de développer des pathologies métaboliques comme le diabète de type II ou l'obésité. Par exemple, les individus exposés *in utero* à la famine hollandaise, adaptés à un environnement carencé pendant la vie fœtale mais confrontés à un environnement riche en nutriments après la guerre, présentaient un risque accru de développer des pathologies métaboliques à l'âge adulte (Ravelli et al, 1998). Notons que le moment de l'exposition à la sous-nutrition détermine la nature de ses effets, avec plutôt des pathologies cardiovasculaires et de l'obésité lorsque l'exposition intervenait dans le premier trimestre de la grossesse, plutôt de l'hypertension pour l'exposition au second trimestre et plutôt des pathologies liées à l'homéostasie glucidique pour l'exposition au troisième trimestre (Painter et al, 2005). Des effets transgénérationnels ont même été observés par les voies maternelle et paternelle (Veenendaal et al, 2013).

Aujourd'hui, la programmation fœtale des fonctions physiologiques post-natales a été démontrée expérimentalement dans plusieurs espèces, avec différentes techniques dont le but était de moduler l'environnement intra-utérin et la croissance fœtale. Par exemple, un stress, une hypoxie, une exposition aux glucocorticoïdes, un régime alimentaire ou une insuffisance placentaire en cours de gestation peuvent induire un retard de croissance intra-utérin (RCIU) et entraîner des anomalies post-natales des fonctions cardiovasculaires, métaboliques et endocrines, chez la souris, le lapin, le cochon d'Inde, le mouton, le porc, le cheval (§1.3.3.3) ou encore le primate (McMillen et Robinson, 2005). De la même façon, en cas de RCIU naturel, comme cela est fréquent chez le porc notamment, un petit poids de naissance est associé à une hypertension, une intolérance au glucose et des anomalies des axes endocrines tels que les îlots de Langerhans, le système rénine-angiotensine et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien chez l'adulte (Forhead et al, 2000; Poore et Fowden, 2002, 2003; Gatford et al, 2008). Les études chez l'animal montrent aussi que le moment, la durée et la nature de la perturbation en cours de gestation déterminent la trajectoire de croissance *in utero* et induisent des conséquences physiologiques spécifiques, même si le poids de naissance reste inchangé (Fowden et al, 2006). Enfin, les animaux de rente fournissent des preuves du concept de programmation fœtale *via* l'étude des effets des



**Figure 28.** Périodes critiques de programmation développementale chez les rongeurs et l'Homme (d'après une méta-analyse de Fowden et al, 2006a).

perturbations de l'environnement intra-utérin sur les bénéfices commerciaux relatifs à la survie des descendants voire des générations suivantes, à leur vitesse de croissance et aux qualités de la viande, du lait, de la laine et de la fonction reproductrice (Pond, 1973; Powell et Aberle, 1980; Lawlor et Hopkins, 1981; Wu et al, 2006; Firth et al, 2008; Larson et al, 2009; Blair et al, 2010; Funston et al, 2010; Hill et al, 2010; Reynolds et al, 2010).

### **1.3.1.2. Périodes critiques de programmation développementale**

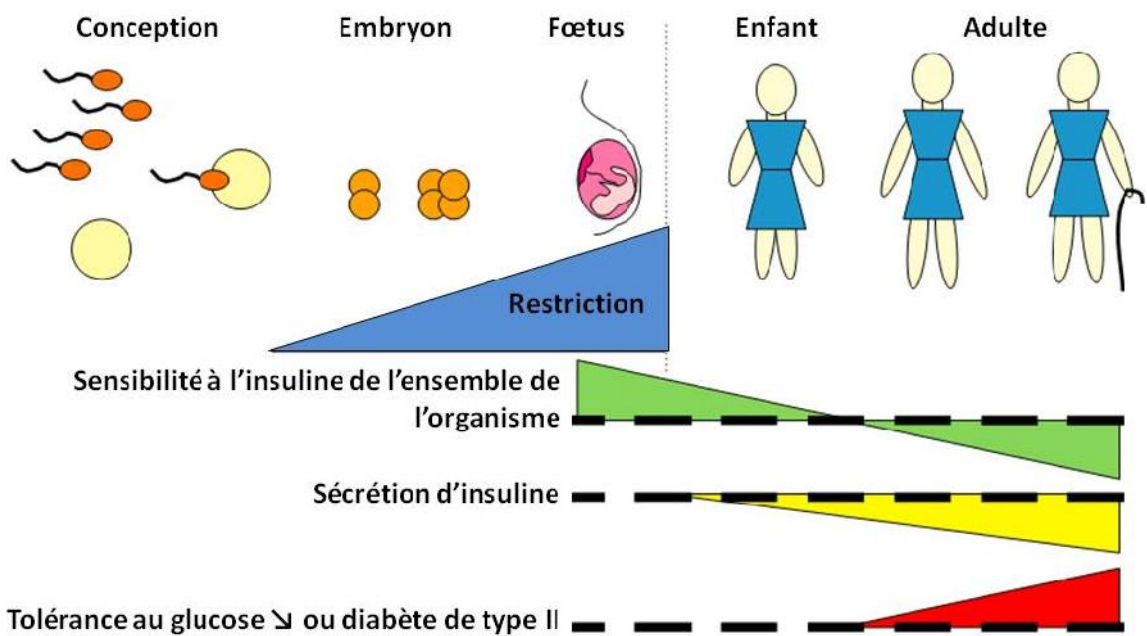
#### **1.3.1.2.1. Périodes périconceptionnelle et préimplantatoire**

Les perturbations environnementales interviennent à différents stades du développement (**Figure 28**). En périconception et dans la période préimplantatoire, la disponibilité en nutriments, en oxygène et en hormones peut affecter l'ovocyte et le développement embryonnaire (notamment la répartition des cellules entre le trophoblaste et la masse cellulaire interne dans le blastocyste). En altérant la croissance fœtale ou encore la durée de gestation, ces perturbations peuvent conduire à des anomalies des grands axes endocrines (McEvoy et al, 2001; Kumarasamy et al, 2005). Notons néanmoins que des adaptations de la fonction de transfert du placenta plus tard en cours de gestation tendent à compenser ces troubles précoces et à normaliser le poids de naissance (Godfrey, 2002).

#### **1.3.1.2.2. De l'implantation à la naissance**

En cours d'organogenèse, les perturbations environnementales causent des anomalies structurales susceptibles de réduire la capacité fonctionnelle des organes (**Figure 28**) (Fowden et al, 2006). Si elles interviennent en cours de gamétogenèse, le potentiel reproducteur des descendants risque d'être altéré (Rhind et al, 2001; Dupont et al, 2012; Chavatte-Palmer et al, 2014; Dupont et al, 2014; Leveille et al, 2014). Dans la période où la croissance fœtale est la plus rapide, elles peuvent altérer la croissance des tissus et changer le cycle cellulaire de prolifération en différenciation, avec des conséquences défavorables sur le nombre de cellules (Harding et Johnston, 1995; Fowden et al, 1998). Puisque les tissus et les organes fœtaux se développent à des vitesses différentes, le moment de la perturbation détermine une réponse adaptative spécifique d'un tissu ou d'un organe (Fowden et al, 2006).

En fin de gestation, une période de maturation au cours de laquelle de nombreux tissus subissent des modifications structurales et fonctionnelles prépare le fœtus pour la vie extra-utérine (**Figure 28**) (Liggins et Howie, 1972; Liggins, 1976; Silver, 1990; Liggins, 1994). La naissance *per se* active des systèmes physiologiques ayant peu, voire pas de fonction *in utero*, tels que la ventilation, la thermorégulation, la néoglucogenèse, la nutrition entérale et le contrôle de l'appétit (Fowden et al, 1998). Des variations de la maturation *prepartum* peuvent avoir des conséquences sur la sensibilité des systèmes physiologiques en périnatal, ces effets pouvant se normaliser, persister ou s'amplifier plus tard (Fowden et al, 2006).



**Figure 29.** Retard de croissance intra-utérin (RCIU) et action de l'insuline chez l'Homme. Les triangles de couleur représentent les effets chez les individus en RCIU par rapport aux individus de poids de naissance normal, chez lesquels les effets sont représentés par les lignes pointillées noires et horizontales (d'après Gatford et al, 2008).

### **1.3.1.2.3. De la naissance au sevrage**

Plusieurs systèmes physiologiques programmés *in utero* continuent à se développer *postpartum* (**Figure 28**). La période de plasticité développementale s'étend donc au-delà de la naissance. Chez le rat, les variations néonatales de la disponibilité en nutriments, des concentrations hormonales et du comportement maternel peuvent altérer la fonction cognitive, neuroendocrine et reproductive de l'adulte (Ozanne et Hales, 2002; Weaver et al, 2004; Bouret et Simerly, 2006; Attig et al, 2008; Attig et al, 2011; Attig et al, 2013). En conséquence, les perturbations environnementales post-natales, en particulier avant le sevrage, peuvent améliorer ou exacerber les modifications morphologiques et fonctionnelles programmées *in utero* (Fowden et al, 2006).

Il ne s'agit donc plus de « programmation fœtale » uniquement, mais de « programmation développementale » ou « origines développementales de la santé et des maladies » (ou DOHaD, *developmental origins of health and disease*), puisque les événements *in utero* et pendant la croissance post-natale sont susceptibles d'affecter à long terme la santé et le bien-être des individus (Reynolds et Caton, 2012).

## **1.3.2. Origines fœtales des anomalies de l'homéostasie glucidique et du squelette**

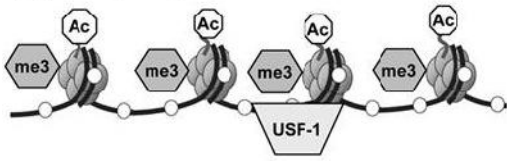
### **1.3.2.1. Origines fœtales des anomalies de l'homéostasie glucidique**

#### **1.3.2.1.1. Origines fœtales du diabète de type II chez l'Homme**

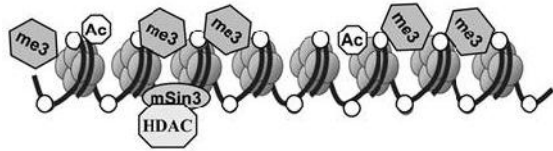
Une forte corrélation négative entre le poids de naissance et le risque de développer un diabète de type II à l'âge adulte a été mise en évidence par les études épidémiologiques, à commencer par l'étude de 468 hommes de la cohorte du Hertfordshire. Des tests oraux de tolérance au glucose ont montré que les sujets avec un petit poids de naissance avaient développé une intolérance au glucose à l'âge de 64 ans (Hales et al, 1991). Cette corrélation a été confirmée par l'étude de 103 hommes et femmes (de poids proches au moment de l'étude) vivant à Preston (Phillips et al, 1994), puis par l'étude d'adolescents nés avec un RCIU (Hofman et al, 1997), dans lesquelles les patients les plus légers à la naissance étaient les moins sensibles à l'insuline. Cette hypothèse d'une association entre une croissance fœtale restreinte et une insulino-résistance voire un diabète de type II chez l'adulte (Newsome et al, 2003) a été vérifiée dans d'autres pays, notamment la France (Leger et al, 1997) et la Suède (Lithell et al, 1996).

Une étude suggère que la sensibilité à l'insuline du nouveau-né est négativement corrélée à sa taille à la naissance (**Figure 29**) (Bazaes et al, 2003). Cette sensibilité à l'insuline accrue du bébé en RCIU contribuerait au phénomène post-natal de croissance de rattrapage et diminuerait dès l'âge d'un an (Soto et al, 2003; Ong et al, 2004; Mericq et al, 2005). Chez l'individu sain, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline entraîne une diminution de la

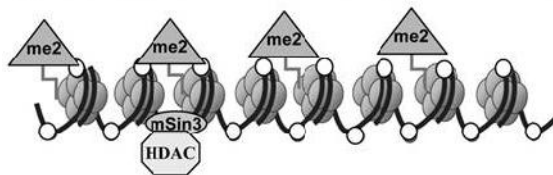
(a) Îlots  $\beta$  du pancréas normaux



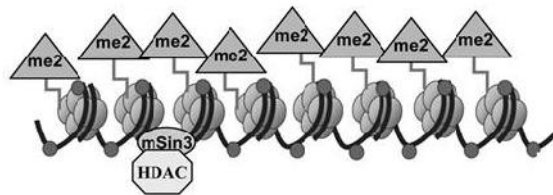
(b) Îlots  $\beta$  du pancréas chez le fœtus en RCIU



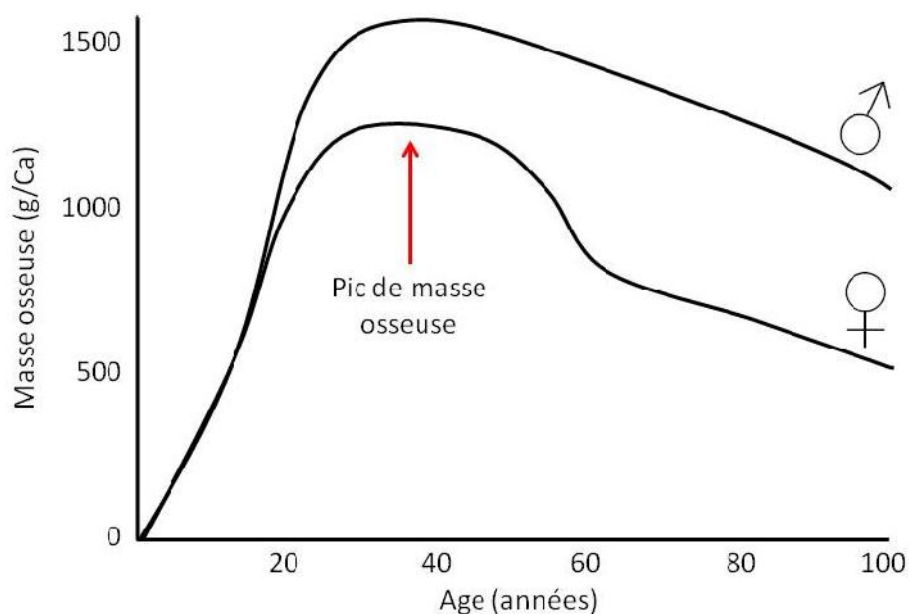
(c) Îlots  $\beta$  du pancréas chez rat en RCIU à 2 semaines



(d) Îlots  $\beta$  du pancréas chez rat en RCIU à l'âge adulte



**Figure 30.** Schéma des modifications épigénétiques du promoteur du gène *Pdx1* impliquées dans le développement du diabète de type II chez le rat. (a) Etat normal du promoteur de *Pdx1*, avec une chromatine déméthylée (ronds blancs) et décondensée ce qui permet aux facteurs de transcription (comme USF-1) d'accéder à l'ADN et avec des histones acétylés (Ac, octogones) et présentant la marque H3K4me3 (Me3, hexagones). (b) et (c) Etat du promoteur chez le fœtus en RCIU ou le rat âgé de deux semaines, avec une perte progressive de l'acétylation *via* le complexe répresseur mSin3A-HDAC1-DNMT1 et l'apparition après la naissance de la marque H3K9me2 (Me2, triangles) aux dépens de H3K4me3. (d) Etat du promoteur de *Pdx1* chez l'adulte, caractérisé par une chromatine inactive, la présence de H3K9me2 et une méthylation importante de l'ADN (ronds gris), inhibant la transcription de *Pdx1* (d'après Park et al, 2008).



**Figure 31.** Acquisition de la masse osseuse au cours de la vie (d'après Dennison et al, 2013).

sécrétion d'insuline. Chez l'individu en RCIU, la sécrétion d'insuline ne s'adapte pas à la diminution de la sensibilité à l'insuline, contribuant à un risque accru de développer une intolérance au glucose ou un diabète de type II à long terme (**Figure 29**) (Jensen et al, 2002; Veening et al, 2003; Mericq et al, 2005).

#### **1.3.2.1.2. Un modèle expérimental de modification de la croissance fœtale**

Entre autres modèles de restriction de la croissance fœtale, un modèle ovin de restriction placentaire a été développé (ablation des caroncules avant l'établissement de la gestation). Il induit un RCIU (Alexander, 1964; Wigglesworth, 1964) dont les effets sur l'homéostasie glucidique ressemblent à ceux observés chez l'Homme. Les agneaux dont les placentas ont été restreints étaient 25% plus petits à la naissance, puis ils subissaient une croissance de rattrapage rapide (De Blasio et al, 2007). Jusqu'à l'âge de 30 jours, la sensibilité à l'insuline des agneaux restreints était augmentée (De Blasio et al, 2007; Gatford et al, 2008) et, avec l'âge, la tendance s'inversait et les mâles adultes présentaient une sensibilité à l'insuline diminuée (Owens et al, 2007b; Gatford et al, 2008). Alors que la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques des fœtus restreints était réduite (Owens et al, 2007a; Gatford et al, 2008), elle était augmentée chez le mouton adulte. Mais la fonction altérée de leurs cellules  $\beta$  pancréatiques (diminution de l'expression de certains gènes) entraînait malgré tout une réduction de la sécrétion d'insuline (Gatford et al, 2008).

Cette transition d'une sensibilité à l'insuline accrue à une sensibilité à l'insuline réduite trouve en fait son origine dans des variations épigénétiques. Un modèle murin de restriction placentaire (ligature de l'artère utérine en fin de gestation) a en effet mis en évidence une hypométhylation de l'ADN et une acétylation accrue des histones dans le foie et le cerveau des fœtus en RCIU (MacLennan et al, 2004; Ke et al, 2006). Mais jusqu'à l'âge de deux semaines, l'acétylation des histones diminuait progressivement tandis que la méthylation devenait très dense, en particulier au niveau du promoteur du gène *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1* ou *insulin promotor factor 1*) impliqué dans la régulation du développement pancréatique et la différenciation des cellules (**Figure 30**) (Park et al, 2008).

#### **1.3.2.2 Origines fœtales de la masse osseuse**

##### **1.3.2.2.1. Origines fœtales de la masse osseuse chez l'Homme**

Chez l'Homme, des études épidémiologiques ont relié la taille à la naissance au développement d'ostéoporose chez l'adulte. Or, le risque de fracture est aussi déterminé par la masse osseuse (combinaison de la taille des os et de la densité minérale volumétrique) qui confère sa résistance mécanique à l'os (Dennison et al, 2013). Chez l'Homme adulte, la masse osseuse dépend principalement de la hauteur du pic de masse osseuse atteint à la fin de la croissance du squelette puis de la vitesse de perte osseuse (**Figure 31**) (Ferrari et al,



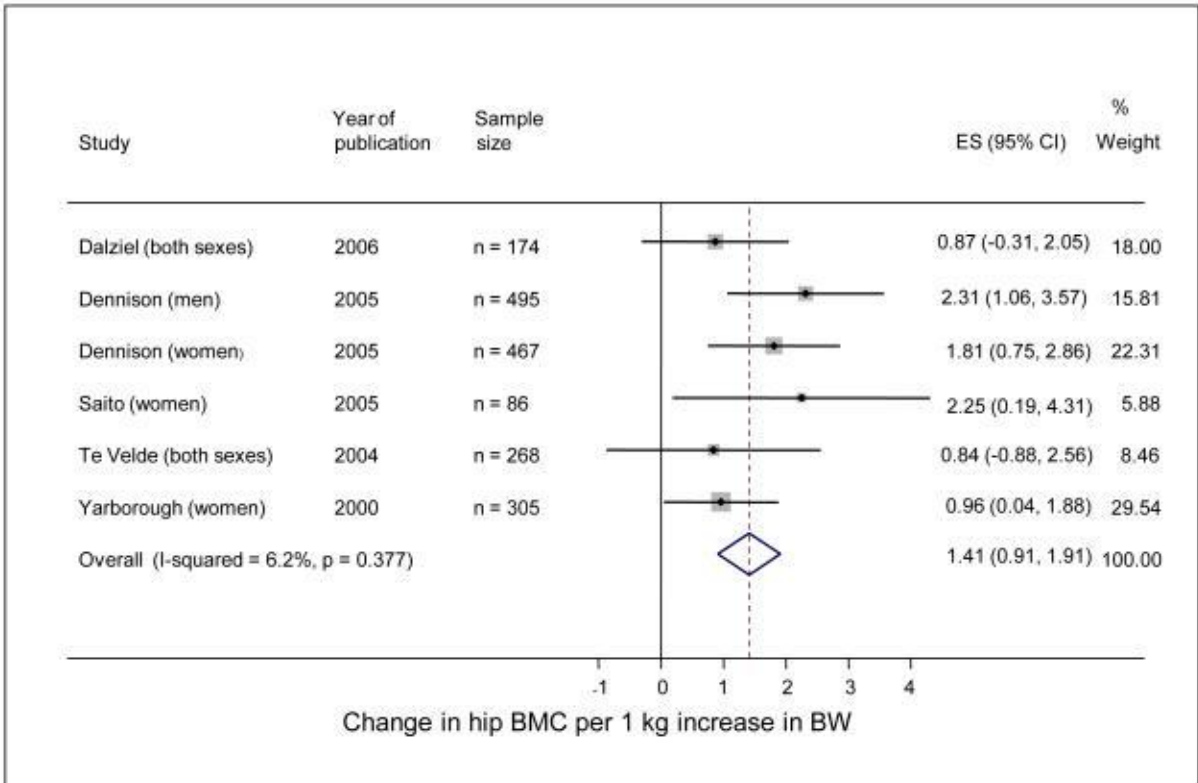


1998). Ce pic de masse osseuse est ainsi un bon indicateur de l'âge auquel l'ostéoporose commencera à se développer (Hernandez et al, 2003).

Plus de 60% du pic de masse osseuse est acquis au cours de la puberté, période cible pour optimiser l'accrétion osseuse (par les apports calciques et l'exercice) (Kajantie, 2008), mais une part importante est acquise plus précocement. En effet, la minéralisation des os du fœtus est modulée par l'alimentation maternelle (en particulier les apports en vitamine D) et son activité physique, ainsi que par sa consommation éventuelle de tabac (Godfrey et al, 2001; Cooper et al, 2006; Javaid et al, 2006a; Ioannou et al, 2012). De plus, la masse osseuse néonatale d'un individu est corrélée positivement non seulement à son poids et à sa taille à la naissance, mais aussi au poids du placenta (Godfrey et al, 2001).

L'origine fœtale de la masse osseuse adulte est illustrée par la cohorte du Hertfordshire. L'étude de ces individus a montré que le poids de naissance est corrélé positivement à la surface osseuse (SO) et au contenu minéral osseux (CMO) du fémur proximal et des lombaires chez les femmes et chez les hommes et, dans une moindre mesure et uniquement chez les patients masculins, à la densité minérale osseuse (DMO =  $CMO \times SO$ ) de ces mêmes sites (Cooper et al, 1997; Dennison et al, 2005b). Cependant, c'est un modèle combinant poids de naissance, poids à l'âge d'un an et poids adulte qui rend le mieux compte de la variabilité de la surface osseuse du fémur chez les deux sexes, soulignant l'importance des trajectoires de croissance anté- et post-natales dans l'acquisition de la masse osseuse. Ces corrélations sont préservées après ajustement des données selon plusieurs paramètres du mode de vie des adultes susceptibles d'affecter la masse osseuse tels que l'activité physique, l'apport calcique et la consommation de tabac et d'alcool (Dennison et al, 2005b; Dennison et al, 2013). La résistance de l'os est aussi déterminée par sa géométrie comme démontré sur des patients de cette même cohorte. L'analyse de la structure fémorale et des propriétés biomécaniques du radius et du tibia suggère qu'une croissance ralentie *in utero* et au cours de la première année après la naissance est associée à un col fémoral plus étroit (Javaid et al, 2006b) et à un tibia plus court, de plus petite surface, avec un indice de résistance diminué (Oliver et al, 2007) conduisant à une résistance mécanique moindre et un risque de fracture accru (Dennison et al, 2013).

Dans une cohorte finlandaise, il a été montré que les individus nés avec une petite taille mais rattrapant la taille moyenne de la population à l'âge de 7 ans avaient un risque augmenté de fracture de la hanche (Cooper et al, 2001; Javaid et al, 2011). D'autre part, dans une cohorte sud-brésilienne, les jeunes hommes les plus lourds à la naissance présentaient une surface osseuse et un CMO augmentés dans le fémur proximal, le col du fémur et les lombaires, ainsi qu'une DMO augmentée dans les lombaires, sans qu'aucune interaction ne soit relevée entre les variables pré- et post-natales (Schlüssel et al, 2010). Enfin, une méta-analyse a montré en 2011 que 1 kg supplémentaire à la naissance



**Figure 32.** Représentation graphique d'études mesurant la corrélation entre le poids de naissance et le contenu minéral osseux de la hanche chez l'adulte (d'après Dennison et al, 2013).

correspond à une augmentation de 1,49 g du CMO des lombaires et à une augmentation de 1,41 g du CMO dans la hanche (**Figure 32**) (Baird et al, 2011; Dennison et al, 2013).

#### **1.3.2.2. Quelques modèles expérimentaux de modification de la croissance fœtale**

Quelques modèles expérimentaux, essentiellement murins, ont étayé cette hypothèse d'une programmation fœtale de la masse et de la structure osseuse. En effet, chez la souris, une restriction énergétique maternelle (70% *versus* 100% des besoins énergétiques) diminue le CMO des descendants à l'âge de 6 mois, mais seulement chez certaines races et les effets varient selon le sexe (Knight et al, 2007). Chez le rat, la ligature des artères utérines cause un RCIU et les descendant mâles et femelles ont des fémurs plus courts, des os plus fins et de moindre résistance jusqu'à l'âge de 6 mois (Engelbregt et al, 2004; Romano et al, 2010). La surnutrition a aussi un impact défavorable sur le tissu osseux des descendants, puisqu'un diabète maternel est associé à une plus faible teneur en calcium des os et à un retard de minéralisation du squelette (Verhaeghe et al, 1999). De plus, un régime riche en graisses saturées réduit la masse osseuse fœtale en fin de gestation (Liang et al, 2009) et diminue la longueur du fémur, tout en augmentant son diamètre (Lanham et al, 2010).

### **1.3.3. Origines fœtales de la santé et des performances chez l'équin**

#### **1.3.3.1. Intérêt de l'étude des origines développementales de la santé chez l'équin**

##### **1.3.3.1.1. Commerce et valorisation des poulains et jeunes chevaux**

La majorité des chevaux dans les pays développés sont des chevaux de sport participant à des compétitions de tous niveaux : leurs aptitudes sportives déterminent leur valeur économique et celle de leurs descendants. Avant même qu'ils aient couru ou concouru, le commerce des poulains pèse lourd sur la balance économique de la filière, comme l'illustrent les ventes aux enchères de très jeunes animaux en France telles que les ventes ARQANA pour les jeunes trotteurs et galopeurs et les ventes FENCES pour les jeunes chevaux de sport et de loisir. Ainsi, lors des ventes ARQANA de 2013, les foals (< 1 an) ont rapporté 4,1 millions d'euros, les yearlings (< 2 ans), 54,9 millions d'euros et les chevaux à l'entraînement de moins de 2 ans et plus, 20,5 millions d'euros. Lors des ventes FENCES de 2013, les animaux de moins de 4 ans ont rapporté 2,3 millions d'euros (IFCE, 2014).

D'autre part, afin de les valoriser et de les sélectionner, les jeunes chevaux et poneys de sport sont soumis à un circuit d'épreuves organisé par la Société Hippique Française pour former et confronter les chevaux de 4, 5 et 6 ans. Ce circuit concerne 6 disciplines (saut d'obstacles, hunter, dressage, concours complet, endurance et attelage), avec plus de 8 200 épreuves (66% en saut d'obstacles) et plus de 4,7 millions d'euros de gains (3,7 pour le saut d'obstacles) en 2012 (IFCE, 2014).



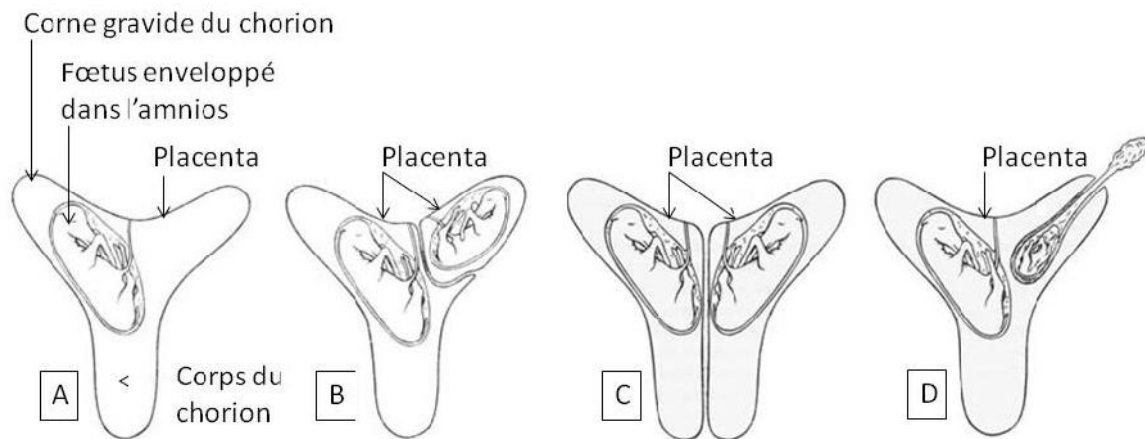
### **1.3.3.1.2. Durée de la carrière sportive du cheval**

La notion de longévité, d'abord définie chez les espèces de rente, correspond chez le cheval à la durée de sa carrière en compétition. La longévité a une origine génétique et fait partie des objectifs d'élevage de certains stud-books (Koenen, 2004; Braam, 2011; Ricard et Blouin, 2011). Elle a une héritabilité de 0,07 à 0,17 (Braam, 2011; Ricard et Blouin, 2011) et est évaluée à 2-3 ans pour le Pur-Sang en course de plat et le Trotteur Américain en course attelée. Elle est à peine plus longue pour le dressage, le saut d'obstacles ou le concours complet où elle est évaluée à 3-4 ans. Les principales causes de ces fins de carrières précoces sont les lésions du muscle ou du squelette, puis les désordres respiratoires et gastro-intestinaux. Les lésions du muscle ou du squelette, notamment, sont responsables de 56 à 79% des jours d'entraînement perdus et d'environ 25% des pertes économiques de la filière (Rogers, 2012). Les éleveurs aspirent à limiter ces pertes et à optimiser la durée de la carrière en compétition. De plus, au-delà de l'investissement financier, le bien-être du cheval est aujourd'hui un impératif moral. Les éleveurs se concentrent donc sur la gestion du cheval alors qu'il est déjà en compétition. Or, quelques données indiquent une plasticité fœtale aux *stimuli* maternels chez le cheval (§1.3.3.2 et 1.3.3.3). Le développement et la croissance seraient ainsi des fenêtres potentielles d'intervention pour atténuer le risque de traumatismes ou de lésions avec une stimulation *ad hoc* des tissus.

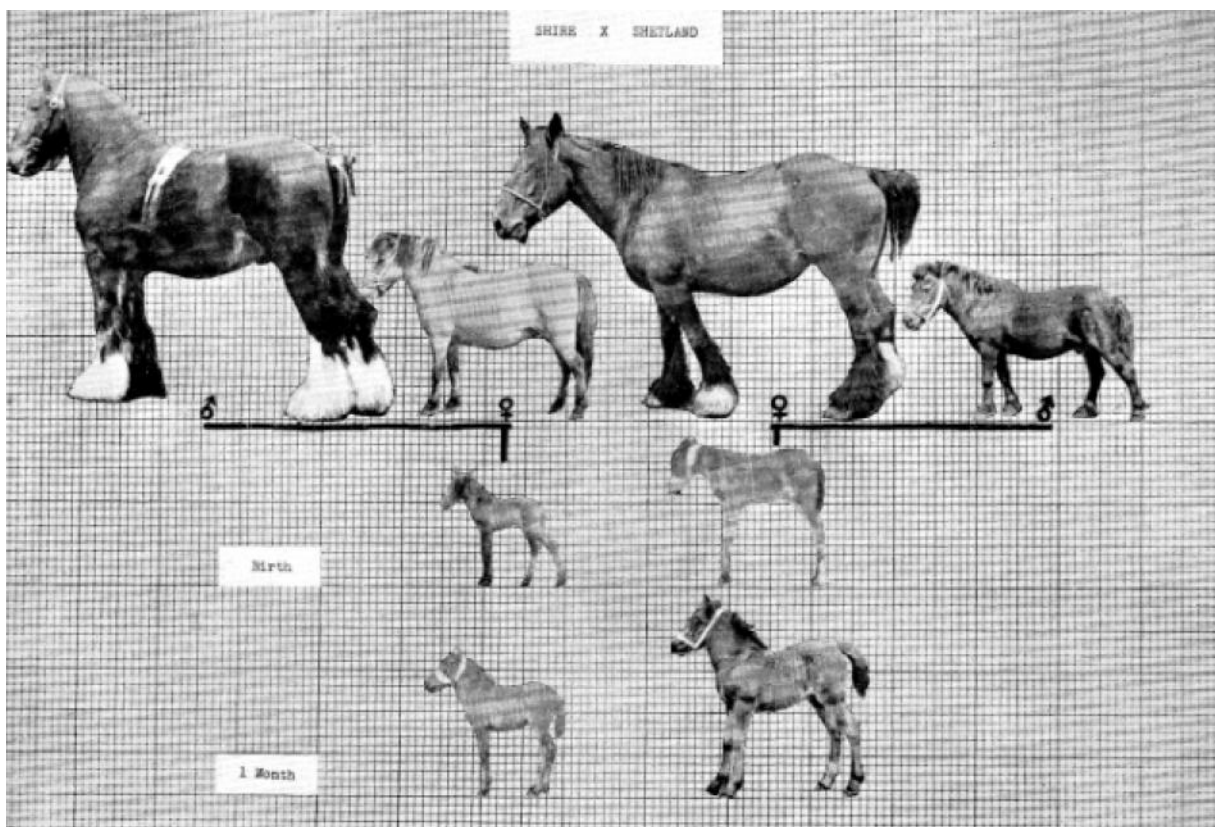
### **1.3.3.2. Retard de croissance intra-utérin et santé chez l'équin**

L'étude du lien entre RCIU et pathologies de l'adulte mis en évidence par les études épidémiologiques chez l'Homme (Barker et Osmond, 1986) est particulièrement pertinente chez le cheval destiné à des performances sportives exigeantes. Le RCIU chez le cheval est rarement diagnostiqué si la survie du poulain n'est pas en jeu et si des soins vétérinaires ne sont pas nécessaires. En revanche, il est souvent associé à une prématurité ou à une dysmaturité (animal né à terme mais présentant des signes de prématurité) (Rossdale et Silver, 1982; Rossdale et al, 1984; Rossdale, 1985; Rossdale et al, 1997). Rossdale et ses collègues associent le RCIU à une insuffisance pulmonaire chez le nouveau-né (atélectasie, détresse respiratoire), une arythmie respiratoire dans la période post-natale immédiate, un déséquilibre des proportions des bronchioles, alvéoles et artérioles terminales (prédisposition à l'hémorragie pulmonaire induite à l'exercice), des neuropathies (hémiplegie laryngée) et d'autres pathologies dont l'hyperlipémie, la pathologie pulmonaire obstructive chronique, les myopathies et l'ostéochondrose (Ansari et al, 1998; Rossdale, 2002).

Toutes les altérations de l'environnement extérieur (stress, qualité nutritionnelle des aliments, carences et excès dans la ration, agents infectieux, toxiques) et des interfaces entre le fœtus et l'environnement extérieur (santé du tractus digestif, troubles pulmonaires, affections chroniques de l'endomètre, pathologies placentaires, homéostasie maternelle) sont susceptibles de perturber la croissance fœtale et/ou d'avoir des répercussions à long



**Figure 33.** Compétition pour l'attachement du placenta en cas de gestation gémellaire. A : singleton, B : jumeaux de même taille, C : jumeaux de tailles différentes, D : momification d'un des jumeaux. Les jumeaux sont un modèle naturel de retard de croissance intra-utérin (d'après Jeffcott et Whitwell, 1973 dans Rosedale et Ousey, 2002).



**Figure 34.** Parents et poulains des croisements réciproques entre des poneys Shetland et des chevaux de trait de race Shire (d'après Walton et Hammond, 1938).

terme. Si les causes possibles du RCIU chez le cheval sont peu documentées, quelques modèles existent (Rossdale, 2002). D'occurrence spontanée, les gestations gémellaires sont un modèle naturel de RCIU car les deux placentas sont en compétition pour l'attachement à l'endomètre. Elles conduisent à la mort fœtale ou à des poulains très petits car sous-nutris *in utero*, avec de faibles chances de survie (**Figure 33**). Expérimentalement, quelques modèles de RCIU équin existent : décollement placentaire en milieu ou fin de gestation (Rossdale et al, 1991), placentite induite expérimentalement (Leblanc et al, 2001) et transfert d'embryons de race Pur-Sang dans des receveuses de taille réduite (ponettes) (§1.3.3.3) (Allen et al, 2002b).

### 1.3.3.3. Modèles équins expérimentaux de programmation fœtale

#### 1.3.3.3.1. Modèles expérimentaux de modification de la croissance fœtale

En 1934 et 1936, Walton et Hammond ont croisé de grands chevaux de trait de race Shire avec des petits poneys Shetland par insémination artificielle. Lorsque le père était de race Shire et la mère de race Shetland, les poulains avaient une taille proche de celle des Shetlands à la naissance. Lorsque le père était de race Shetland et la mère de race Shire, les poulains avaient une croissance fœtale augmentée, sans pour autant atteindre la taille d'un poulain de race Shire (**Figure 34**). Ces différences étaient exacerbées par la production laitière réduite des ponettes et abondante des juments de trait. Elles ont persisté jusqu'à l'âge de trois ans (Walton et Hammond, 1938).

En 1985, après avoir produit trois paires d'embryons (même parents au sein de chaque paire) de race poney Konik, Tischner a transféré un embryon de chaque paire dans une jument de trait tandis que l'autre était porté par sa mère biologique. A la naissance, les poulains issus des transferts étaient plus grands et plus lourds que leurs frères et ont grandi plus vite pendant la lactation (Tischner, 1985). Après le sevrage et jusqu'à l'âge de quatre ans et demi, bien que les différences entre les individus aient diminué, les poulains issus des transferts étaient toujours plus grands (hauteur au garrot, hauteur de l'antérieur et longueur du canon)(Tischner, 1987). Ces études sont les premières à illustrer la prévalence de l'environnement maternel sur le potentiel génétique du poulain : il est possible de moduler le potentiel de croissance normal de la race en faisant varier la taille de la jument. D'ailleurs, une étude américaine utilisant la même approche (six paires d'embryons de race Quarter Horse), mais avec des receveuses de même taille différant par leur parité (nullipares ou multipares), a montré que c'est bien la taille de la jument receveuse et non sa parité qui est importante (Pool-Anderson et al, 1994).

Plus récemment, Allen et ses collègues ont utilisé le transfert d'embryons entre des races de différentes tailles (poneys et Pur-Sang anglais) comme modèle de restriction (Pur-Sang dans poney) ou d'augmentation (poney dans Pur-Sang) de l'apport nutritionnel au fœtus. Les poneys portés par des juments Pur-Sang étaient plus lourds dès la naissance, avec





**Figure 35.** Photographies des poulains issus des transferts inter-races le lendemain de leur naissance. A gauche : poulain Pur-Sang dans poney, montrant des signes de retard de croissance intra-utérin (croupe et membres postérieurs démusclés, hyperlaxité des boulets, sabots malformés). A droite : poulain poney dans Pur-Sang, plus grand, mieux musclé, plus robuste, avec des sabots bien formés (d'après Allen et al, 2002).



**Figure 36.** Photographies des poulains issus des transferts inter-races à l'âge de 14 mois. A gauche : le poulain de gauche est un Pur-Sang dans poney et celui de droite est un Pur-Sang classique. A droite : le poulain de gauche est un poney dans Pur-Sang et celui de droite, un poney classique (d'après Allen et al, 2004).

des proportions augmentées jusqu'à l'âge de trois ans (**Figure 35 et 36**) (Allen et al, 2004; Ousey et al, 2004). A l'âge de 2 jours, ces poneys présentaient aussi une sensibilité au glucose des cellules  $\beta$  pancréatiques accrue (Forhead et al, 2004) et, à l'âge de 6 jours, une augmentation de la pression artérielle basale et de la réactivité adrénocorticale à l'adrénocorticotrophine, ainsi qu'une diminution de la sensibilité du baroréflexe et de la sécrétion de catécholamines en réponse à une hypotension aiguë (Giussani et al, 2003). *A contrario*, les nouveau-nés Pur-Sang portés par des ponettes présentaient un RCIU à la naissance (**Figure 35**) (Allen et al, 2002b; Ousey et al, 2004). L'homéostasie glucidique n'était pas affectée à 2 jours (Forhead et al, 2004), mais un hypercorticisme était observé pendant les 2 premiers jours après la naissance (Ousey et al, 2004). De plus, la sensibilité du baroréflexe et la sécrétion de catécholamines en réponse à une hypotension aiguë étaient augmentées à l'âge de 6 jours (Giussani et al, 2003). A l'âge de trois ans, les poulains avaient globalement rattrapé leur retard de croissance (**Figure 36**) (Allen et al, 2004).

#### **1.3.3.3.2. Intérêt du modèle de transferts d'embryons inter-races dans la pratique**

Le transfert d'embryon est la technique de reproduction la moins utilisée en France (**Tableau 10**), mais elle est en plein essor, avec 193 *versus* seulement 6 étalons actifs (étalons ayant réalisé au moins une saillie l'année considérée) respectivement en 2013 et 2012 (IFCE, 2014).

Dans les premiers travaux publiés sur le transfert d'embryon chez l'équin en 1972, les japonais Oguri et Tsutsumi ont réussi à collecter des zygotes par voie transcervicale puis ont essayé, toujours par voie transcervicale, de les transférer dans une receveuse (Oguri et Tsutsumi, 1972), sans succès jusqu'en 1974 où six receveuses sur quinze (40%) étaient gravides et donnaient naissance à quatre poulains en bonne santé (Oguri et Tsutsumi, 1974). Les essais en France n'ont débuté qu'en 1982 (Lagneaux et al, 1988) et le premier transfert d'embryon commercial a été réalisé en 1985 à l'INRA de Tours (Lagneaux, 1999). De 1989 à 2012, environ 7 000 poulains sont nés par cette technique en France (Caillaud et Doligez, 2013).

Dix pays rapportaient l'utilisation du transfert d'embryon équin en 2013 (**Tableau 11**). Avec 31 135 embryons collectés (issus de 44 273 flushs) et transférés en 2013, le Brésil et l'Argentine étaient les pays les plus actifs. Ce rendement de 0,7 embryon par flush illustre la difficulté d'obtenir des embryons transférables dans cette espèce. Les huit autres pays rapportaient moins de 100 embryons collectés et transférés en 2013. La France était absente du rapport 2013 de la Société Internationale du Transfert d'Embryon (IETS) qui faisait état d'une sous-évaluation du nombre de transferts d'embryon. En effet, ces données sont très difficiles à obtenir, tous les propriétaires, éleveurs et praticiens ne déclarant pas les poulains issus de transferts d'embryon comme tels. Ainsi, le nombre de transferts en 2013 était estimé à 15 000 aux Etats-Unis et à 3 000 en Europe (IETS, 2013).

Nombre d'étalons actifs par technique de monte						
Type de monte	Chevaux de course	Chevaux français de selle	Chevaux étrangers de selle	Poneys	Chevaux de trait	Anes
IA congelée	3	494	299	120	10	1
IA immédiate	361	170	100	56	12	10
IA réfrigérée sur place	3	60	25	13	36	0
IA réfrigérée transport	0	131	105	33	39	1
Liberté	14	466	466	811	1 358	124
Monte en main camion	1	1	1	1	0	0
Monte en main sur place	489	619	464	464	944	119
Transfert d'embryons	1	110	76	6	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>872</b>	<b>2 051</b>	<b>1 536</b>	<b>1 504</b>	<b>2 399</b>	<b>255</b>

Nombre de saillies par technique de monte						
Type de monte	Chevaux de course	Chevaux français de selle	Chevaux étrangers de selle	Poneys	Chevaux de trait	Anes
IA congelée	7	3 870	2 657	725	16	1
IA immédiate	15 110	1 568	1 096	346	51	118
IA réfrigérée sur place	5	483	188	46	451	0
IA réfrigérée transport	0	1 010	1 440	187	676	3
Liberté	65	2 342	1 775	4 260	12 355	607
Monte en main camion	2	1	1	2	0	0
Monte en main sur place	10 505	3 061	1 612	1 940	8 659	557
Transfert d'embryons	1	292	285	9	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>25 695</b>	<b>12 627</b>	<b>9 054</b>	<b>7 515</b>	<b>22 208</b>	<b>1 286</b>

Tableau 10. Techniques de reproduction en France en 2013 (d'après IFCE, 2014).

Pays	Collectes		Transferts			Exports
	Flushs	Embryons <i>in vivo</i>	Embryons frais	Embryons nationaux congelés	Embryons étrangers congelés	
Argentine	22 173	14 335	14 335	7	0	0
Brésil	22 100	16 800	16 800	0	0	0
Canada	65	32	30	0	0	0
Finlande	1	5	1	0	0	0
Italie	0	91	74	0	0	0
Mexique	22	17	28	8	0	0
Pologne	1	1	1	0	0	0
Suisse	0	7	7	0	0	0
Thaïlande	0	0	0	0	0	0
Etats-Unis	64	43	47	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>44 426</b>	<b>31 331</b>	<b>31 323</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Tableau 11. Pratique du transfert d'embryons dans le monde en 2013 (d'après IETS, 2013).

Aujourd'hui, le transfert d'embryon est utilisé comme méthode « thérapeutique » pour les juments peu fertiles (juments qui débutent une gestation mais présentent des mortalités embryonnaires à répétition, juments atteintes de lésions endométriales, juments présentant des déchirures cervicales irréparables ou juments qui avortent régulièrement sans raison évidente), comme moyen d'amélioration génétique de la race dans le cas des juments d'exception ou encore comme alternative à l'arrêt de la carrière sportive des juments en compétition pour en faire des poulinières. Peu de recommandations concernent le choix des juments receveuses : elles doivent être relativement jeunes (entre 3 et 10 ans), présenter une cyclicité ovarienne normale et n'avoir aucun antécédent pathologique en matière de reproduction. Idéalement, il faudrait que les receveuses soient au moins aussi grandes voire légèrement plus grandes que les donneuses et sont généralement sélectionnées car faciles à manipuler, reconnues bonnes laitières et bonnes mères (Blanchard et al, 2005). Les juments de race trait ont été beaucoup utilisées pour cette raison. Cette pratique n'est plus d'actualité : aujourd'hui, les receveuses de race Trotteur sont privilégiées.

Chaque stud-book définit les techniques de reproduction autorisées dans la race. A l'heure actuelle, le transfert d'embryon est autorisé notamment chez le Selle Français, l'Anglo-Arabe et le cheval de trait. Pour le Trotteur Français, une seule gestation issue de transfert d'embryon est autorisée par an pour une donneuse ayant eu des performances en course ou dont les descendants ont eu des performances en course et après avis de la commission du stud-book. Cette technique est interdite chez le Pur-Sang et l'AQPS (Autre Que Pur-Sang) (**Tableau 12**) (Caillaud et Doligez, 2013).

#### **1.3.3.3.3. Modèles expérimentaux de programmation par la nutrition maternelle**

Dans le but d'optimiser la croissance fœtale, les éleveurs distribuent souvent des rations riches en énergie aux poulinières, avec une teneur élevée en glucides tels que l'amidon. Or, les expériences de transfert d'embryons entre poneys et Pur-Sang ont démontré que l'augmentation des apports nutritionnels au fœtus amplifie la croissance fœtale et post-natale et la sensibilité au glucose des cellules  $\beta$  pancréatiques (§1.3.3.3.1) (Allen et al, 2004; Forhead et al, 2004).

Ousey et ses collègues ont cherché à explorer les effets de la nutrition maternelle en excès en utilisant deux lots de juments Pur-Sang recevant dès le 1<sup>er</sup> mois de gestation deux régimes différents à base de concentrés et de foin, pour obtenir un lot de juments « obèses » et un lot de juments à l'état corporel « modéré ». Dès le 1<sup>er</sup> jour après la naissance, un test intraveineux de tolérance au glucose a démontré que les cellules  $\beta$  pancréatiques des poulains du lot « modéré » étaient plus sensibles au glucose (Ousey et al, 2008). Ces observations sont cependant à nuancer : l'ensemble du troupeau a été atteint par une infection à *Streptococcus equi* (gourme) ayant occasionné une perte d'appétit et donc une perte pondérale au 2<sup>nd</sup> trimestre de gestation. L'étude de George et ses collègues dans

Race du produit	IA sur place (en frais)	IA transportée (frais/congelé)	Transfert d'embryon
Pur sang	Interdit	Interdit	Interdit
Trotteur français	Autorisé	Interdit	Interdit
Arabe	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Anglo-Arabe	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Selle français	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Camargue	Interdit	Interdit	Interdit
Ariégeois de Castillon	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Merens	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Henson	Interdit	Interdit	Interdit
Barbe	Interdit	Interdit	Interdit
Lusitanien	Autorisé	Interdit	Interdit
Appaloosa	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Lipizzan	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Quarter horse	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Shagya	Autorisé	Autorisé	Interdit
Trakehner	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Islandais	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Cheval de selle	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Connemara	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Dartmoor	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Poney français de selle	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Landais	Autorisé	Autorisé	Autorisé
New-forest	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Pottok	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Welsh	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Haflinger	Interdit	Interdit	Interdit
Highland	Interdit	Interdit	Interdit
Shetland	Interdit	Interdit	Interdit
Fjord	Autorisé	Autorisé	Interdit
Poney	Autorisé	Autorisé	Autorisé
Races de trait	Autorisé	Autorisé	Autorisé

Tableau 12. Modes de reproduction artificielle autorisés ou non en fonction des races d'équidés en France. Situation en octobre 2003 (d'après Blanchard, 2005).

laquelle des juments Pur-Sang ont reçu un régime riche ou pauvre en amidon (maïs) à partir du 7<sup>ème</sup> mois de gestation arrivent néanmoins à des conclusions similaires : les poulains du lot « riche » ont tendance à être moins sensibles à l'insuline à l'âge de 5 mois que les poulains du lot « pauvre » (George et al, 2009). Il a aussi été montré que les poulains nés de juments ayant reçu une ration hivernale pauvre en énergie étaient moins sensibles à l'insuline à l'âge de deux semaines, avec une insulïnémie à jeun plus élevée à 2 semaines, 4 et 10 mois (Dobbs et al, 2012). Enfin, l'étude de Cavinder et ses collègues dans laquelle des juments Quarter Horse ont été conduites uniquement au pâturage (ration couvrant 100% des recommandations du NRC) ou conduites au pâturage et complétées avec des céréales (ration couvrant 120% des recommandations du NRC) montre que les nouveau-nés du lot 100% ont des concentrations plasmatiques en leptine plus élevées, sans que la fonction surrénale ne soit affectée à la naissance et à 1 an (Cavinder et al, 2012).

Les modèles expérimentaux de programmation du métabolisme du poulain par la nutrition maternelle utilisent relativement peu d'individus, de races différentes et avec des rations différentes entre les études, rendant les généralisations difficiles. En 2013, une étude épidémiologique belge a montré pour la première fois une augmentation de l'incidence des lésions d'OC chez les poulains nés de 208 juments ayant reçu une ration à base de concentrés (céréales, granulés ou aliments complets du commerce), indépendamment de la présence de fibres (herbe, foin, ensilage ou paille) (van der Heyden et al, 2013a). Ces résultats confirment l'hypothèse d'une origine fœtale et plus précisément d'une programmation nutritionnelle de certaines pathologies du cheval.

#### **1.3.3.4. Origines fœtales de l'ostéochondrose**

Carlsten et ses collègues ont été les premiers à émettre l'hypothèse que le développement des lésions d'OC commencerait avant la naissance (Carlsten et al, 1993). En effet, des lésions histologiques de type OC ont été observées très précocement chez des poulains, entre 2 et 18 jours (Rejno et Stromberg, 1978; Carlson et al, 1995; Henson et al, 1997; Olstad et al, 2007). Dans certaines études, il a été montré que la supplémentation en cuivre des juments gravides diminue l'incidence des lésions du cartilage articulaire chez les poulains à 15 mois (Pearce et al, 1998a; Pearce et al, 1998b; Pearce et al, 1998c). Pourtant, ces résultats ne font pas l'unanimité car une autre étude a démontré l'absence d'effet de la supplémentation en cuivre (par injection) des juments en fin de gestation sur l'incidence des lésions d'OC chez les poulains (Gee et al, 2007). L'étude épidémiologique citée ci-dessus (§1.3.3.3.3) confirme malgré tout le rôle de l'alimentation de la jument gravide : l'incidence des lésions d'OC augmente chez les poulains nés de juments ayant reçu des concentrés (van der Heyden et al, 2013a).



### 1.3.3.5. Place du placenta équin dans la programmation fœtale

Chez la jument, le placenta est en contact avec l'endomètre sur l'ensemble de sa surface. L'apport nutritionnel au fœtus est ainsi déterminé par la capacité utérine, corrélée à la taille maternelle. Allen et ses collègues ont été les premiers à se pencher sur un possible lien entre variations de la croissance fœtale et altérations de la morphologie et microstructure placentaire chez le cheval. Ainsi, l'augmentation (poney dans Pur-Sang) et la restriction (Pur-Sang dans poney) de la croissance *in utero* étaient déterminées par la croissance de l'allantochorion puisque poids, surface et volume du placenta étaient augmentés dans le premier cas et restreints dans le second. Ces changements s'accompagnaient respectivement d'une augmentation et d'une restriction de la surface totale des microcotylédons, qui est la surface disponible pour les échanges fœto-maternels hémotrophiques (Allen et al, 2002b).

L'analyse des placentas des juments « obèses » *versus* « modérées » a révélé une augmentation de la surface placentaire en cas de régime « obèse », cependant sans effet sur la croissance fœtale (Wilsher et Allen, 2006). En revanche, l'infection à *Streptococcus equi* et la perte de poids maternelle qui l'a accompagnée ont augmenté la surface d'échange disponible, de nouveau sans effet sur la croissance fœtale (Wilsher et Allen, 2006). Les variations de la morphologie et microstructure placentaires n'affectent donc pas systématiquement le poids à la naissance et pourraient au contraire participer aux adaptations permettant de maintenir la croissance fœtale.

Cependant, la structure placentaire n'est pas la seule composante des échanges fœto-maternels et d'autres caractéristiques du développement placentaire doivent être envisagées. Les flux sanguins et transporteurs des nutriments dans le placenta sont aussi des acteurs essentiels de la capacité de transfert du placenta et de la croissance du fœtus (Jones et al, 2007; Desforges et Sibley, 2010). Ils n'ont à ce jour fait l'objet d'aucune exploration dans les modèles équins expérimentaux de programmation fœtale.





## En résumé

Certaines anomalies post-natales de l'homéostasie glucidique, de l'acquisition et du maintien du squelette trouvent en partie leur origine dans la vie anténatale, la gestation étant une succession de fenêtres de plasticité, sensibles aux *stimuli* environnementaux. Ce concept de programmation foetale trouve son origine dans des études épidémiologiques chez l'Homme, largement étayées par de nombreux modèles expérimentaux chez l'animal.

Peu de modèles équins de programmation foetale existent. Il s'agit d'un modèle utilisant des transferts d'embryons inter-races et de quelques modèles de perturbations de la nutrition maternelle en fin de gestation. Ces modèles ont mis en évidence un impact des événements précoces du développement sur quelques grands axes physiologiques du poulain, notamment sur son métabolisme du glucose, sa croissance et sa prédisposition à l'ostéochondrose.

Le placenta est un organe clef de la relation entre la jument et son foetus et des altérations de sa structure sont impliquées dans l'établissement du phénotype post-natal du poulain. Cependant, de nombreux aspects du développement placentaire associés au mécanisme programmeur restent un mystère dans cette espèce.



## 1.4. Objectifs de la thèse

### 1.4.1. Problématique de la thèse

La gestation et la croissance post-natale chez le cheval sont deux fenêtres de plasticité des tissus aux *stimuli* environnementaux. Elles constituent ainsi deux fenêtres potentielles d'intervention pour optimiser à long terme le bien-être, les aptitudes sportives et en particulier la santé du squelette de l'animal. En effet, le cheval athlète présente souvent des lésions d'ostéochondrose d'étiologie multifactorielle. Ces altérations de l'os suspendent voire mettent un terme à sa carrière, représentant de lourdes pertes économiques pour la filière équine. Entre autres facteurs, cette pathologie est liée à des troubles du métabolisme énergétique et notamment de la régulation de la glycémie, système sensible aux conditions intra-utérines.

**Cette thèse a pour objectif d'explorer les origines développementales et plus précisément fœtales des anomalies de l'homéostasie glucidique et de la croissance osseuse susceptibles d'être associées au développement de lésions d'ostéochondrose chez les poulains entre la naissance et l'âge de 18 mois.**

Au cours de ces travaux, nous avons induit des perturbations de la croissance fœtale et nous avons évalué les effets post-nataux à long terme sur la sensibilité à l'insuline et le développement osseux des poulains. Nous nous sommes aussi attachés à caractériser le développement du placenta, organe clef de la communication entre la jument et son fœtus.

### 1.4.2. Approche retenue et étapes de la thèse

Deux modèles expérimentaux ont été retenus pour répondre aux objectifs du projet :

- le **modèle 1** (2010-2014) utilise des transferts d'embryons entre des races de tailles différentes, avec un suivi de la croissance, du métabolisme glucidique et du statut ostéoarticulaire des poulains (données collectées de la naissance à 18 mois) ;
- le **modèle 2** (2012-2014) compare deux rations alimentaires (supplémentation ou non avec un aliment concentré) chez des juments gravides, avec un suivi de la croissance, du métabolisme glucidique et du statut ostéoarticulaire du poulain (données collectées de la naissance au sevrage à 6 mois).



Les travaux rapportés dans cette thèse sont organisés en 5 parties :

- la **Partie 2.1** présente l'établissement des modèles 1 et 2, les paramètres suivis chez les juments et les poulains et les méthodes de mesure ;
- la **Partie 2.2** présente la croissance pondérale, les facteurs endocrines de croissance et le métabolisme glucidique des poulains du modèle 1 de la naissance au sevrage (article publié dans PLoS ONE) ;
- la **Partie 2.3** présente la croissance pondérale, les facteurs endocrines de croissance et le métabolisme glucidique des poulains du modèle 1 du sevrage à 18 mois (article en préparation pour soumission à PLoS ONE) ;
- la **Partie 2.4** présente la croissance et le statut ostéoarticulaire des poulains du modèle 1 de la naissance à 18 mois (article en préparation pour soumission à Journal of Animal Science) ;
- la **Partie 2.5** présente la structure et la fonction placentaires dans le cadre du modèle 1 (article en préparation pour soumission à Theriogenology) ;
- la **Partie 2.6** présente la croissance, les facteurs endocrines de croissance, le métabolisme glucidique et le statut ostéoarticulaire des poulains du modèle 2 de la naissance au sevrage (article en préparation pour soumission à Journal of Nutrition).



## 2. Travaux

Cette thèse s'inscrit dans le projet FOETALIM. Initié en 2010, il se poursuivra au moins jusqu'en 2017. Financé par l'Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE), ce projet est construit et mis en œuvre par l'UMR 1198 « Biologie du Développement et Reproduction » de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Jouy en Josas (78).

Les parties expérimentales ont fait appel à :

- la station expérimentale de l'IFCE à Chamberet (19),
- l'UE 1293 « Physiologie Animale de l'Orfrasière » (UEPAO) de l'INRA de Tours (37).

Ces travaux ont été menés à bien grâce à des collaborations avec :

- le Centre Européen du Cheval de Mont-le-Soie (Belgique) qui a contribué à la mise en place de certains tests métaboliques et a assuré le suivi des lésions ostéoarticulaires,
- le laboratoire départemental Frank Duncombe à Caen (14) qui a permis les analyses biochimiques des marqueurs du turnover osseux et cartilagineux,
- l'UMR 85 « Physiologie de la Reproduction et des Comportements » de l'INRA de Tours (37) qui nous a fait bénéficier de son expérience en endocrinologie et a contribué à certains dosages radio-immunologiques,
- l'UMR 791 « Modèles Systémiques Appliqués aux Ruminants » de l'INRA de Paris (75), également impliquée dans certains dosages.

La collecte des données incluses dans cette thèse a commencé au printemps 2010 et s'est achevée au printemps 2014.



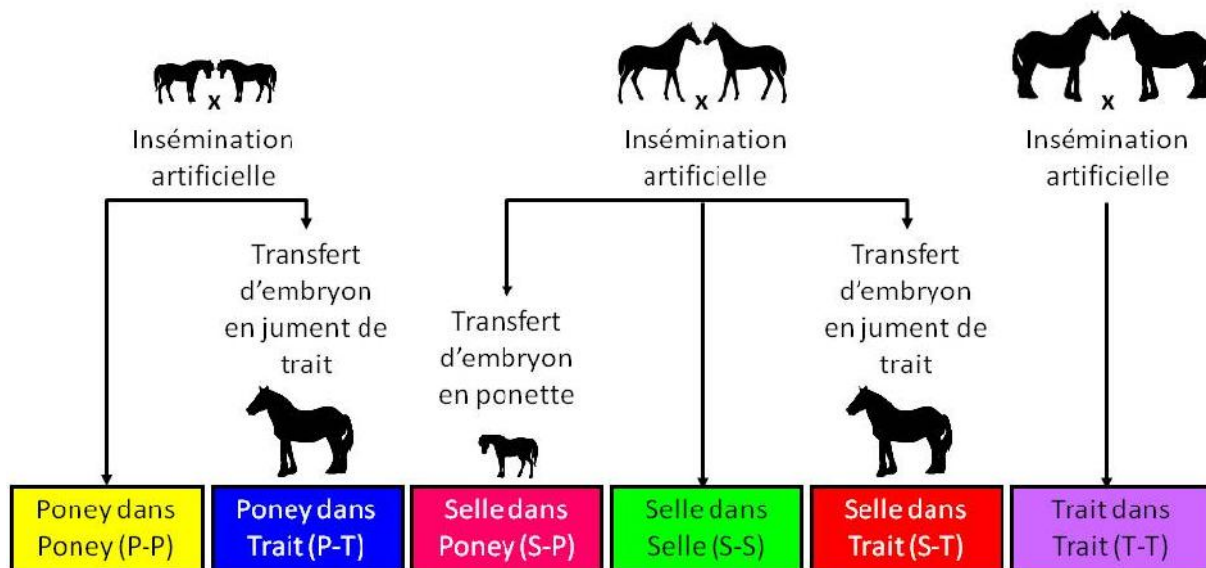


Figure 37. Modèle 1 : transferts d'embryons entre races de tailles différentes.

Objectif	Témoins			Croissance fœtale restreinte	Croissance fœtale augmentée	
	Poney	Selle	Trait		Poney	Selle
Race du fœtus	Poney	Selle	Trait	Selle	Poney	Selle
Race de la jument	Poney	Selle	Trait	Poney	Trait	Trait
Lot	P-P	S-S	T-T	S-P	P-T	S-T
Poulains nés en 2011	10	18	0	2	5	8
Poulains nés en 2012	11	10	8	4	1	0
Total	21	28	8	6	6	8
Ratio M/F	9/12	12/16	5/3	4/2	2/4	2/6
Pertes	3M+6F	4M+3F	1M	0	0	0

Tableau 13. Etablissement des lots témoins et expérimentaux du modèle 1: effectifs, ratios mâles/femelles (M/F) et pertes enregistrées en cours de protocole. Les pertes sont dues à des diarrhées à rotavirus ou des septicémies pour les nouveau-nés, à des coliques ou des accidents pour les poulains plus âgés.

## 2.1. Protocole expérimental

L'ensemble de ces travaux a été approuvé par le comité local dédié au bien-être et à l'utilisation des animaux (« Comité des Utilisateurs de la Station Expérimentale de Chamberet ») et par le comité d'éthique local (« Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale du Limousin ») sous le numéro 5-2103-5.

### 2.1.1. Modèles expérimentaux

#### 2.1.1.1. Modèle 1 : transferts d'embryons entre races de tailles différentes

##### 2.1.1.1.1. Etablissement du modèle

Le modèle 1 s'est inspiré des travaux de Allen et ses collègues (§1.3.3.3.1) (Allen et al, 2002a; Giussani et al, 2003; Allen et al, 2004; Forhead et al, 2004; Ousey et al, 2004) avec des transferts d'embryons entre trois races : des poneys (Welsh), des chevaux de selle (Selle Français, Anglo-Arabe et Pur-Sang) et des chevaux de trait (Comtois et Bretons). Les poneys sont ceux de l'UEPAO de l'INRA de Tours, tandis que les chevaux de selle et les chevaux de trait - loués le temps du projet à des élevages bouchers - sont ceux de la station expérimentale de l'IFCE à Chamberet. Ces races ont été choisies pour leurs conformations différentes, mais aussi car elles présentent des métabolismes glucidiques spécifiques : les poneys sont moins sensibles à l'insuline comparés aux chevaux de selle et de trait (Jeffcott et al, 1986; Rijnen et van der Kolk, 2003; Bamford et al, 2014). De plus, elles ne présentent pas la même prédisposition à l'ostéochondrose : des lésions sont rarement rapportées chez les poneys et les chevaux de trait, contrairement aux chevaux de selle (§1.2.2.2.1).

**L'objectif de ce modèle était d'augmenter ou de restreindre la croissance fœtale.**

L'établissement du modèle 1 est résumé dans la **Figure 37** et le **Tableau 13**. Les gestations ont été obtenues en deux saisons de reproduction successives, avec des naissances aux printemps/été 2011 et 2012. Vingt-deux ponettes, 28 juments selle et 22 juments de trait ont été utilisées pour les inséminations artificielles, pour la production des embryons et comme receveuses. Trois lots témoins ont été obtenus par insémination artificielle (poney-dans-poney **P-P**, selle-dans-selle **S-S** et trait-dans-trait **T-T**). Pour restreindre la croissance fœtale, des embryons selle (produits à Chamberet et transportés à Tours) ont été transférés dans des ponettes (selle-dans-poney **S-P**). Pour augmenter la croissance fœtale, des embryons poneys (produits à Tours et transportés à Chamberet) et selle ont été transférés dans des juments de trait (poney-dans-trait **P-T** et selle-dans-trait **S-T**). Afin de limiter la variabilité génétique entre les individus, la semence d'un seul étalon poney, d'un seul étalon trait et de deux étalons de selle (sans lien de parenté) a été utilisée.

<b>Lot</b>	<b>Station</b>	<b>Méthode de reproduction</b>	<b>Dates en 2010</b>	<b>Dates en 2011</b>
<b>P-P</b>	UEPAO	IA	du 24/05/10 au 28/05/10	du 08/07/11 au 02/08/11
<b>S-S</b>	IFCE	IA	du 23/05/10 au 08/08/10	du 25/06/11 au 05/08/11
<b>T-T</b>	IFCE	IA	-	du 04/06/11 au 05/08/11
<b>S-P</b>	UEPAO	TE	le 01/06/10 et le 01/07/10	du 22/07/11 au 08/08/11
<b>P-T</b>	IFCE	TE	du 19/05/10 au 16/06/10	le 01/06/11
<b>S-T</b>	IFCE	TE	du 08/06/10 au 27/07/10	-

**Tableau 14.** Dates d'établissement des gestations témoins par insémination artificielle (IA) et expérimentales par transferts d'embryons (TE) pour le modèle 1 dans chaque station et à chaque saison de reproduction.

Les transferts d'embryons et inséminations artificielles ont été réalisés par Mme Wimel, M. Dubois, M. Duchamp et M. Reigner.

#### **2.1.1.1.2. Conduite des juments**

L'objet de cette partie est de donner au lecteur une vue d'ensemble de la conduite des juments gravides puis allaitantes. Les apports alimentaires seront rapportés dans les parties 2.2 et 2.3.

La principale difficulté du modèle 1 en termes de conduite d'élevage était la répartition des animaux entre deux stations expérimentales séparées l'une de l'autre par un peu plus de 300 km, avec chacune des structures et une organisation propres. Dans les deux stations, les juments ont été conduites au pâturage à partir de la date de l'insémination artificielle (lots témoins) ou du transfert d'embryon (lots expérimentaux) (**Tableau 14**), avec accès libre à un complément minéral et vitaminique. Les ponettes ont été conduites en un seul lot sur une même parcelle au sein de la station de l'UEPAO et les juments de selle et de trait ont été conduites en deux lots sur deux parcelles au sein de la station de l'IFCE, pour des raisons sanitaires (les juments de trait venaient d'être introduites au sein de la station).

Dans les deux stations, les juments gravides ont été rentrées en boxes paillés ou en stabulations individuelles paillées début novembre (en 2010 et en 2011), ce qui correspond en moyenne sur l'ensemble des six lots des deux saisons au 5<sup>ème</sup> mois de gestation. A la station de l'UEPAO, un paddock bétonné est attenant à chaque boxe, les ponettes ont donc profité de cet accès extérieur dans la journée. A la station de l'IFCE, les stabulations possèdent une petite surface extérieure en libre accès. Ce n'est pas le cas des boxes. Toutes les juments de selle et de trait ont été sorties deux fois par semaine dans une parcelle proche du bâtiment.

Le moment de la rentrée en boxe ou en stabulation correspond au début de la supplémentation hivernale des juments gravides dans les deux stations, selon les recommandations établies par l'INRA en fonction de la race et du stade de gestation (Martin-Rosset, 2012). Dans les deux stations, les juments ont reçu du foin deux fois par jour (en début de matinée et en fin d'après-midi) et ont été supplémentées en même temps avec des concentrés : du tourteau de soja ou un aliment concentré du commerce (Eperon, Tellus Nutrition Animale, France), à la station de l'UEPAO et un mélange préparé sur place d'orge aplati, de tourteau de soja et de mélasse ou, ponctuellement, du foin de moha en tout début d'hivernage, à la station de l'IFCE. A la station de l'UEPAO, le complément minéral et vitaminique était en libre accès et à la station de l'IFCE, il était intégré au mélange concentré.

Les ponettes de la station de l'UEPAO (toujours en un seul lot sur une même parcelle) sont retournées au pâturage 10 jours après la parturition et les juments de selle et de trait

<b>Lot</b>	<b>Station</b>	<b>Dates de naissance en 2011</b>	<b>Dates de naissance en 2012</b>
<b>P-P</b>	UEPAO	du 21/04/11 au 08/05/11	du 04/06/12 au 08/07/12
<b>S-S</b>	IFCE	du 17/04/11 au 29/06/11	du 29/05/12 au 19/07/12
<b>T-T</b>	IFCE	-	du 21/05/12 au 07/07/12
<b>S-P</b>	UEPAO	le 23/05/11 et le 19/06/11	du 03/07/12 au 13/07/12
<b>P-T</b>	IFCE	du 06/04/11 au 14/05/11	le 18/04/12
<b>S-T</b>	IFCE	du 03/05/11 au 19/06/11	-

**Tableau 15.** Dates de naissance des poulains témoins et expérimentaux pour le modèle 1 dans chaque station et à chaque saison de reproduction.

de la station de l'IFCE (toujours en deux lots sur deux parcelles) sont retournées au pâturage 3 jours après la parturition (avec accès libre à un complément minéral vitaminique). Elles y sont restées jusqu'au sevrage à 6 mois. Pendant les quelques jours où les juments sont restées au boxe ou en stabulation après la parturition, elles ont reçu une ration composée des mêmes aliments qu'en fin de gestation, en quantités adaptées aux besoins de lactation de chaque race selon les recommandations de l'INRA (Martin-Rosset, 2012). Soulignons que les deux ponettes porteuses de poulains de selle (lot S-P) en 2010-2011 sont restées 2 mois au boxe après la parturition, d'abord car leurs poulains ont eu des difficultés à se lever pour téter et ont eu besoin de l'assistance des techniciens de la station de l'UEPAO, puis parce qu'ils présentaient des problèmes articulaires nécessitant de limiter leur niveau d'exercice. Pendant ces 2 mois, les deux ponettes ont reçu une ration composée des mêmes aliments qu'en fin de gestation, en quantités adaptées aux besoins de lactation selon les recommandations de l'INRA (Martin-Rosset, 2012). Elles ont été sorties quotidiennement dans un paddock proche du bâtiment.

#### **2.1.1.1.3. Conduite des poulains**

Après leur naissance aux printemps/été 2011 et 2012 (**Tableau 15**), les poulains témoins ont été élevés par leurs mères biologiques et les poulains expérimentaux ont été élevés par leur mère porteuse. Jusqu'au sevrage à 6 mois, les poulains mâles et femelles ont été conduits en pâture ensemble (un lot sur une parcelle pour les poneys et deux lots sur deux parcelles pour les chevaux de selle et de trait). La station de l'UEPAO utilise un sevrage progressif sur 1 mois environ : les poulains sont séparés de leurs mères quotidiennement sur une période de plus en plus longue (les poulains et les mères étant dans des stabulations voisines) jusqu'au sevrage définitif. La station de l'IFCE utilise la méthode traditionnelle du sevrage brutal, les poulains étant séparés de leurs mères définitivement en une journée. Chaque année, les poulains ont été sevrés en plusieurs groupes, d'octobre à décembre selon leur âge et la disponibilité en herbe.

A partir du sevrage et jusqu'à 12 mois (hiver), les poulains sont restés en stabulations collectives, consistant en une aire paillée couverte ouverte sur une aire extérieure bétonnée (à la station de l'UEPAO) ou non (à la station de l'IFCE), en libre accès. Les rations ont été déterminées selon les recommandations de l'INRA pour un poulain en croissance de cet âge (Martin-Rosset, 2012), mais leur distribution diffère entre les deux stations. A la station de l'UEPAO, le foin, l'avoine et le tourteau de soja ont été distribués collectivement aux poulains de chaque stabulation en deux repas quotidiens (en début de matinée et en fin d'après-midi), l'accès au complément minéral et vitaminique (Sodical, Salins Agriculture, France) étant libre. A la station de l'IFCE, le foin a aussi été distribué collectivement, en deux repas, mais les stabulations sont équipées de distributeurs automatiques de concentrés qui distribuaient individuellement (grâce à un système de reconnaissance des poulains porteurs d'une puce électronique) un granulé préparé sur place à base d'orge, de tourteau de soja, de mélasse et de complément minéral et vitaminique (Excel Prima S, Chauveau Nutrition,

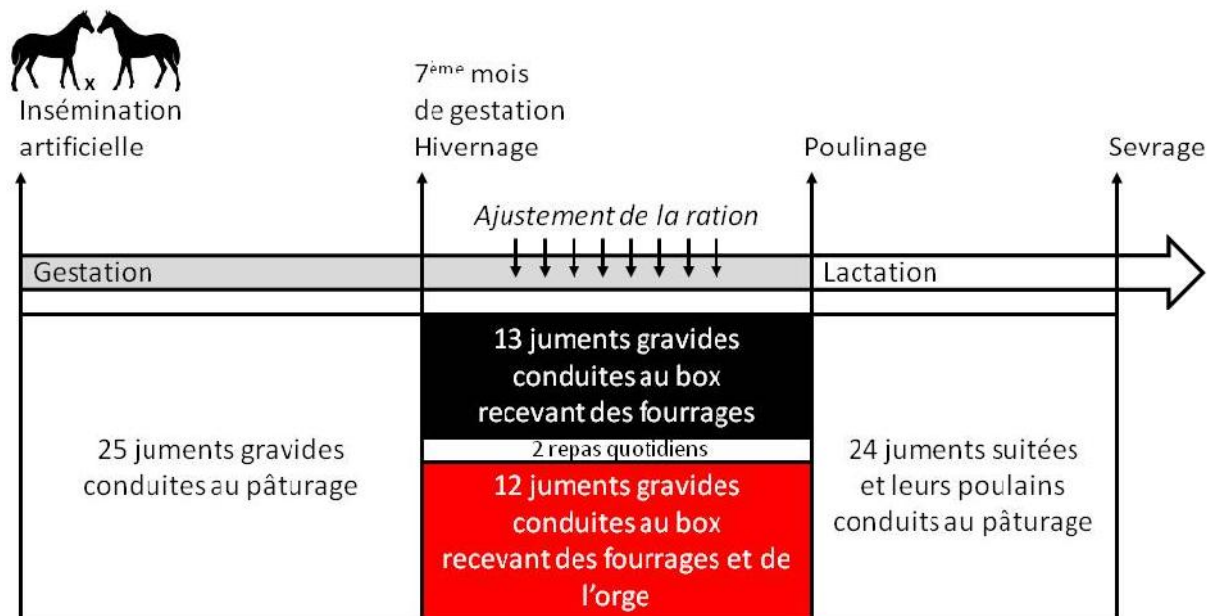


Figure 38. Modèle 2 : apport de concentré dans la ration de la jument gravide.

Objectif	Lot	Juments gravides	Poulains nés en 2013	Ratio M/F	Pertes
Ration complétementée avec de l'orge	C	12	11	6 / 5	1F
Ration à base de fourrages	F	13	13	6 / 7	1M

Tableau 16. Etablissement des lots du modèle 2 : effectifs, ratios mâles/femelles et pertes enregistrées en cours de protocole. Les pertes sont dues à une dystocie et une septicémie.

France). Ce système permet une distribution de la ration à la demande du poulain et en plusieurs repas au cours de la journée. Signalons que les mâles ont été castrés pendant cette période hivernale, à 9 mois environ.

A 12 mois (printemps), l'ensemble des poulains (mâles castrés et pouliches) a été conduit au pâturage jusqu'à 18 mois, où ils ont de nouveau été rentrés en stabulations pour l'hiver. Les poulains de la station de l'UEPAO ont reçu un aliment concentré du commerce (Eperon, Tellus Nutrition Animale, France) deux fois par jour, la distribution étant collective et l'accès au complément minéral et vitaminique libre (Sodical, Salins Agriculture, France). Les poulains de la station de l'IFCE ont aussi reçu leur ration de façon collective, le foin et l'aliment concentré (le même que lors du premier hiver) étant distribué deux fois par jour (en début de matinée et en fin d'après-midi dans les deux stations). Ces rations étaient déterminées sur la base des recommandations de l'INRA pour un poulain en croissance de cet âge (Martin-Rosset, 2012).

### **2.1.1.2. Modèle 2 : apport de concentré dans la ration de la jument gravide**

#### **2.1.1.2.1. Etablissement du modèle**

Le modèle 2 s'est inspiré des travaux de Cavinder et ses collègues et a puisé sa légitimité dans les observations épidémiologiques effectuées par l'équipe du Pr. Serteyn (§1.3.3.3.3) (Cavinder et al, 2012; van der Heyden et al, 2013b). Il est basé sur l'apport (ou non) d'un concentré dans la ration des juments gravides (Selle Français, Anglo-Arabe et Pur-Sang) de la station expérimentale de l'IFCE à Chamberet.

**L'objectif de ce modèle était de compléter la ration hivernale de la jument gravide avec de l'orge.**

Les gestations ont été obtenues en une seule saison de reproduction avec des naissances aux printemps/été 2013. Vingt-cinq juments multipares âgées de 6 à 21 ans ont été inséminées avec la semence d'un seul étalon de selle. Au 7<sup>ème</sup> mois de gestation (fin novembre), elles ont été rentrées en boxes et stabulations individuelles et séparées en deux lots (après appariement selon l'âge, la parité et la hauteur au garrot).

L'établissement du modèle 2 est résumé dans la **Figure 38** et le **Tableau 16**. Le lot « fourrages » (**F**) a reçu du foin et du foin enrubanné. Le lot « concentré » (**C**) a reçu du foin, du foin enrubanné et un mélange d'orge aplati avec un complément minéral et vitaminique (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, France) préparé sur place. Les rations des deux lots ont été distribuées en deux repas quotidiens (en début de matinée et en fin d'après-midi). La ration du lot F a été complétée avec le même complément minéral et vitaminique, distribué en même temps que l'orge du lot C afin que les deux lots, situés dans le même bâtiment, reçoivent en même temps une supplémentation. L'apport nutritionnel des deux





régimes a été ajusté en fonction des besoins associés à chaque stade de gestation (Martin-Rosset, 2012), jusqu'à la parturition.

#### **2.1.1.2.2. Conduite des juments et des poulains**

La distribution des rations aux juments gravides a été décrite ci-dessus et elles ont été sorties deux fois par semaine dans une parcelle proche du bâtiment, comme décrit pour le modèle 1. Après la parturition, les juments et leurs poulains ont été conduits au pâturage en un seul lot jusqu'au sevrage à 6 mois, par la méthode décrite pour le modèle 1, en une seule journée. A partir du sevrage et jusqu'à 12 mois (hiver), les poulains sont restés en stabulations collectives équipées de distributeurs automatiques de concentrés, consistant en une aire paillée couverte ouverte sur une aire extérieure non bétonnée. Le foin a été distribué deux fois par jour (en début de matinée et en fin d'après-midi) et le même granulé préparé sur place à base d'orge, de tourteau de soja, de mélasse et de complément minéral et vitaminique (Excel Prima S, Chauveau Nutrition, France) que celui du modèle 1.

### **2.1.2. Etat corporel et homéostasie énergétique des juments**

#### **2.1.2.1. Poids et notes d'état des juments gravides et allaitantes**

Les juments gravides et allaitantes ont été pesées et leur état corporel a été évalué (**Figure 39**) (attribution d'une note d'état de 1 à 5 (Arnaud, 2000)). L'ensemble de ces mesures a été réalisé par les techniciens expérimentés des deux stations expérimentales, souvent aidés par des stagiaires (BTS, DUT, vétérinaires) présents sur le terrain.

#### **2.1.2.2. Statut énergétique des juments gravides et allaitantes**

Le statut énergétique des juments gravides et allaitantes a été évalué *via* le dosage plasmatique des acides gras non-estérifiés et de la leptine. La concentration plasmatique en acides gras non-estérifiés est un marqueur de la lipomobilisation des triglycérides stockés dans le tissu adipeux. Son augmentation reflète un déficit énergétique de l'organisme. La leptine est sécrétée par les adipocytes et reflète donc la quantité de tissu adipeux. Les acides gras non-estérifiés ont été dosés par Mme Ternois de l'INRA de Paris à l'aide d'une méthode enzymatique colorimétrique utilisant l'appareil Cobas Mira (Roche, Mannheim, Allemagne) et le kit commercial NEFA-HR(2) (Wako Chemical, Allemagne). J'ai dosé la leptine par une méthode radio-immunologique avec le Dr. Camous qui a mis au point cette technique (Salazar-Ortiz et al, 2011).



### 2.1.2.3. Homéostasie glucidique des juments gravides du modèle 2

#### 2.1.2.3.1. Effets de l'apport d'orge sur la glycémie et l'insulinémie au quotidien

Environ deux semaines après le début des régimes C et F (en décembre, au début du 8<sup>ème</sup> mois de gestation), des prélèvements de sang ont été collectés toutes les heures sur une période de 10 heures (début à 8:30 et fin à 18:30) couvrant les deux repas (distribués à 8 :45 et 15 :45). La glycémie a été immédiatement mesurée avec un glycomètre (Medisense Optium Xceed, Abbott, Etats-Unis), tandis que les échantillons de plasma ont été conservés à -20°C jusqu'au dosage de l'insuline. J'ai réalisé ce test avec M. Dubois et M. Bellonie de la station de l'IFCE. J'ai réalisé quelques dosages d'insuline, mais la plupart ont été réalisés par le Dr. Guillaume par une méthode radio-immunologique qu'il a mise au point (Salazar-Ortiz et al, 2011).

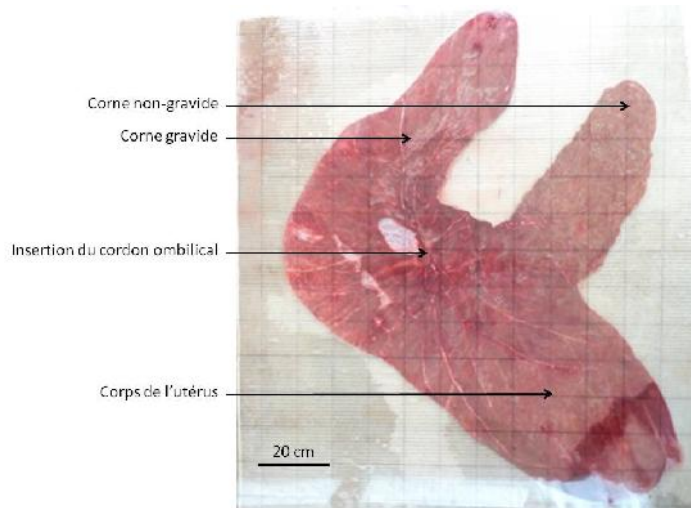
#### 2.1.2.3.2. Effets de l'apport d'orge sur la tolérance au glucose

Des tests intraveineux de tolérance au glucose (*intravenous glucose tolerance tests*, IVGTT) ont été réalisés chez les juments gravides une première fois avant le début des régimes C et F (en août, au 3<sup>ème</sup> mois de gestation) et une seconde fois après qu'ils aient commencé et avant la parturition (au mois de février, au 9<sup>ème</sup> mois de gestation).

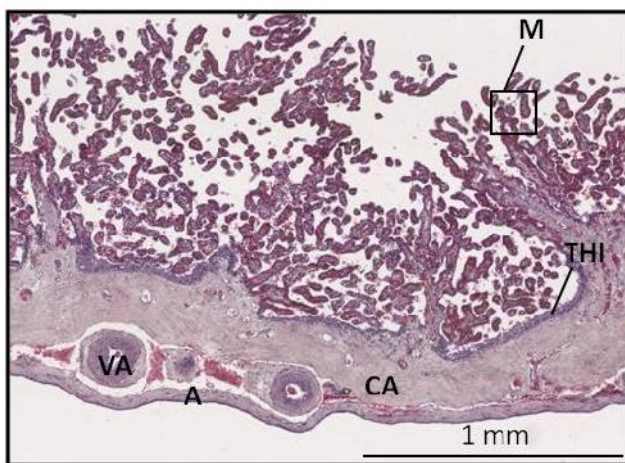
Le principe de l'IVGTT est d'administrer un bolus de glucose par voie intraveineuse à l'individu et de mesurer les concentrations plasmatiques en glucose et en insuline en réponse à l'injection. Cette procédure permet de déterminer la capacité de l'organisme à normaliser sa glycémie, *i.e.*, sa tolérance au glucose et la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  du pancréas.

Après une période de jeûne d'une nuit, les juments ont été perfusées avec 0,25 g/kg de glucose 30% (BBraun, Allemagne) *via* un cathéter placé dans la veine jugulaire sur une période de 5 minutes. Des échantillons de sang veineux ont été prélevés sur tube EDTA à -5, 5, 7, 9, 12, 15, 30 et 60, 90, 120, 150 et 180 minutes après le début de la perfusion. La glycémie a été immédiatement mesurée avec un glycomètre (Medisense Optium Xceed, Abbott, Etats-Unis), tandis que les échantillons de plasma ont été conservés à -20°C jusqu'au dosage de l'insuline. J'ai réalisé tous les IVGTT des juments gravides avec M. Dubois et M. Bellonie de la station de l'IFCE, et avec l'aide de Mlle Valentino dans le cadre de son master 2.

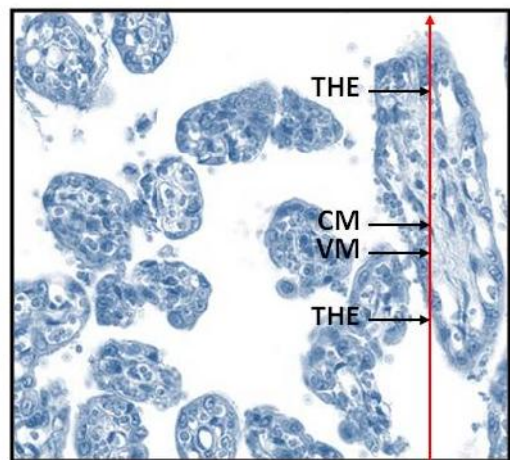
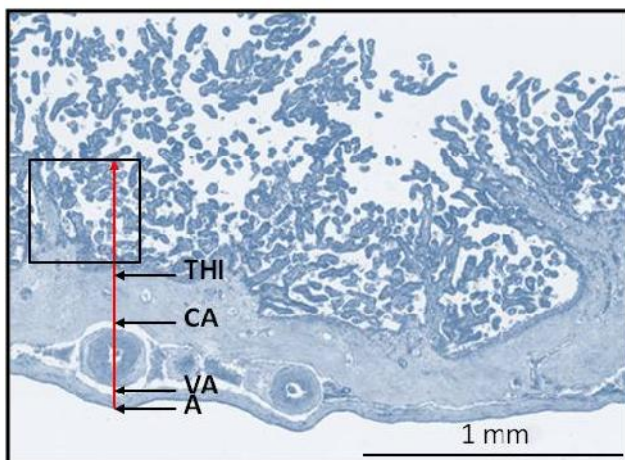
Après normalisation des données de glycémie et d'insulinémie par rapport aux valeurs à -5 minutes, les aires sous courbes des réponses glycémiques et insulinémiques ont été calculées avec la méthode des trapèzes sur toute la période de prélèvement (soit 185 minutes). J'ai réalisé l'ensemble de ces analyses.



**Figure 40.** Photographie de l'allantochorion à terme d'une jument de trait. Le placenta est présenté dans une configuration « en F ». La surface microcotylédonnaire est tournée vers l'extérieur. La plaque en plexiglas quadrillée (carreaux de 10 cm de côté) permet de mesurer la surface de l'allantochorion avec le logiciel ImageJ.



**Figure 41.** Photographie d'une coupe transversale de l'allantochorion équin à terme (à gauche) et agrandissement des villosités microcotylédonnaires (à droite), colorés à l'hématoxyline/éosine. A : allantoïde, VA : vaisseau allantoïdien, CA : conjonctif allantoïdien, THI, trophoblaste histotrophe, M : villosités microcotylédonnaires, VM : vaisseau microcotylédonnaire, THE : trophoblaste hémotrophe et CM : conjonctif microcotylédonnaire.



**Figure 42.** Schéma d'une analyse stéréologique sur un échantillon d'allantochorion à terme. Un dipôle est représenté et chaque entrée du dipôle dans une nouvelle phase du tissu est indiquée au logiciel.

### 2.1.3. Fonction de transfert du placenta à terme

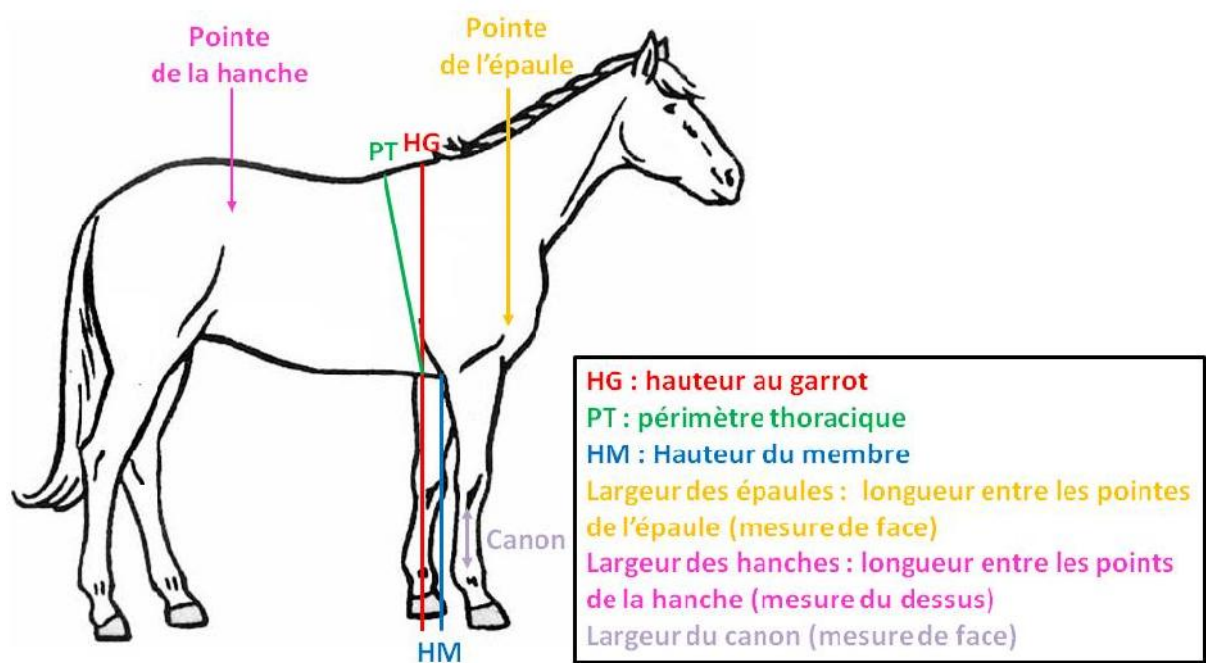
A ce jour, les placentas des deux modèles ont été analysés, mais je présenterai uniquement les résultats issus du modèle 1 dans cette thèse.

#### 2.1.3.1. Morphométrie du placenta et prélèvement des échantillons

A la délivrance, un échantillon d'allantochorion (15 cm x 15 cm) a été immédiatement prélevé à proximité du cordon ombilical et traité pour analyse ultérieure en histologie et en stéréologie et pour analyse de l'expression de gènes candidats. Puis, l'ensemble des annexes foétales (allantochorion et amnios) a été pesé. L'allantochorion a été photographié dans la configuration typique « en F » (**Figure 40**) sous une plaque en plexiglas transparent quadrillée (carreaux de 10 cm x 10 cm) afin que la surface de l'allantochorion puisse être mesurée avec le logiciel ImageJ. Le volume de l'allantochorion a été mesuré par immersion, mais uniquement dans le cadre du modèle 2. Ces données de volume ont permis d'établir une relation linéaire entre le poids et le volume de l'allantochorion. Cette relation a été utilisée pour calculer le volume de l'allantochorion dans le cadre du modèle 1. J'ai participé aux prélèvements d'échantillons d'allantochorion lors des naissances des printemps/été 2012 à la station de l'UEPAO. Lors des autres saisons de reproduction, ce sont les techniciens des stations qui se sont chargés de leur collecte.

#### 2.1.3.2. Histologie et stéréologie de l'allantochorion

Trois fragments (1 cm x 1 cm) de l'échantillon d'allantochorion ont été fixés en formol 4%, puis conservés en tampon phosphate salin à 4°C. Après inclusion en paraffine, les échantillons ont été coupés à 7 µm d'épaisseur et colorés par l'hématoxyline/éosine (**Figure 41**). Une première observation microscopique des coupes a été suivie d'une analyse stéréologique avec le module One Stop Stereology (Reed et al, 2010) du logiciel Mercator (Explora Nova, Hamamatsu, Japon). La stéréologie est une évaluation quantitative (nombre, longueur, surface ou volume) d'une structure en 3 dimensions à partir de sections en 2 dimensions. Les propriétés de ces structures dans l'espace sont quantifiées en «jetant» aléatoirement des sondes (dipôles) dans cet espace, et en repérant chaque entrée de la sonde dans une nouvelle structure. Dans cette étude, la surface et le volume relatifs du trophoblaste hémotrophe, du trophoblaste histotrophe, des vaisseaux des microcotylédons, des vaisseaux allantoïdiens et du conjonctif allantoïdien ont été mesurés pour tous les échantillons d'allantochorion (**Figure 42**). Ces données, rapportées au volume total de l'allantochorion, permettent d'évaluer la surface et le volume absolus de chacune de ces structures. J'ai réalisé les inclusions et les colorations et Mlle Valentino et Mlle Robles ont mené les analyses stéréologiques dans le cadre de leur master 2.



**Figure 43.** Schéma des mensurations réalisées chez les poulains. L'animal doit être calme et d'aplomb sur ses quatre pieds sur une surface plane.

### 2.1.3.3. Expression de gènes candidats dans l'allantochorion

Dix fragments (0,5 cm x 0,5 cm) de l'échantillon d'allantochorion ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Les amorces sens et anti-sens de 15 gènes candidats ont été dessinées et, après extraction des ARN totaux en solution D (Chomczynski et Sacchi, 1987), l'expression de ces gènes a été mesurée par RT-qPCR (*reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*) avec la technique du SYBR Green. Il s'agit de gènes codant des facteurs de croissance fœto-placentaire et leurs récepteurs (*H19*, *IGF-II*, *IGF-IR*, *IGF-IIR*, *EGF-R* et *TGF $\beta$ 1*), des transporteurs du glucose (*SLC2A1*), des acides aminés (*SLC38A1*, *SLC38A2*), des lipides (*CD36*) ou des enzymes impliquées dans l'hydrolyse des triglycérides (*LPL*), des facteurs responsables de la vascularisation du tissu (*VEGF<sub>A</sub>*, *Flt1*, *KDR* et *eNOS*). Trois gènes de référence ont été sélectionnés avec geNorm (*GAPDH*, *RPL32*, *SCAMP3*) et l'expression relative des 15 gènes candidats a été calculée avec le logiciel QBase+. J'ai réalisé les extractions d'ARN avec l'aide de Mme Dahirel, Mlle Valentino a dessiné les amorces et réalisé les RT-qPCR et le Dr. Tarrade a traité les données brutes obtenues.

## 2.1.4. Croissance des poulains

### 2.1.4.1. Mensurations et prélèvements sanguins

La croissance de tous les poulains (modèles 1 et 2) a été évaluée par la pesée, par la mesure du périmètre thoracique et par la mesure de plusieurs segments corporels : la hauteur au garrot, la hauteur de l'antérieur droit, la largeur du canon de l'antérieur droit, la largeur des épaules et la largeur des hanches (**Figure 43**). L'ensemble de ces mesures a été réalisé une fois par mois jusqu'au sevrage à 6 mois, puis à 9, 12 et 18 mois. Des échantillons de sang ont été prélevés avant la première tétée, après un jeûne de 4 heures à 3 jours, de 6 heures jusqu'à 6 mois et d'une nuit à partir de 6 mois. Tous ces prélèvements ont été collectés entre 9:00 et 10:00 sur tubes EDTA, héparine et sérum et conservés à -20°C. L'ensemble de ces mesures et prélèvements ont été réalisés par les techniciens des deux stations, souvent aidés par des stagiaires (BTS, DUT, vétérinaires) présents sur le terrain.

### 2.1.4.2. Dosage des facteurs endocrines de la croissance

Les concentrations plasmatiques en IGF-I, T4 et T3 ont été mesurées à la naissance, à 3, 120, 180, 360 et 540 jours chez les poulains du modèle 1 et à la naissance, 3, 140 et 180 jours chez les poulains du modèle 2. Ces trois facteurs sont essentiels au développement harmonieux du squelette, mais sont aussi des acteurs centraux de l'homéostasie énergétique. J'ai réalisé tous ces dosages avec Mme Dahirel à l'aide de kits radio-immunologiques commerciaux (IGF-1-RIACT, OCPE07-T3 et OCPG07-T4, CISbio International, France).





## 2.1.5. Homéostasie énergétique des poulains

### 2.1.5.1. Statut énergétique des poulains

Le statut énergétique des poulains a été évalué *via* le dosage plasmatique des acides gras non-estérifiés et de la leptine après sevrage pour le modèle 1 et avant sevrage pour le modèle 2.

### 2.1.5.2. Test intraveineux de tolérance au glucose

Forhead et ses collègues ont utilisé des IVGTT pour mettre en évidence des anomalies du métabolisme glucidique dans leur modèle équin expérimental de programmation foétale impliquant des transferts inter-races (§1.3.3.3.1) (Forhead et al, 2004). L'utilisation de cette technique dans la thèse a permis de comparer les résultats obtenus dans les deux projets.

Des IVGTT ont été réalisés à 3 et 360 jours chez tous les poulains du modèle 1 et à 3 et 130 jours chez tous les poulains du modèle 2. Après une période de jeûne (4 heures à 3 jours, 6 heures à 130 jours et une nuit à 360 jours), les poulains ont été perfusés avec 0,25 g/kg de glucose 30% (BBraun, Allemagne) *via* un cathéter placé dans la veine jugulaire sur une période de 1 minute à 3 jours et de 2 minutes à 130 et 360 jours. Des échantillons de sang ont été prélevés sur tube EDTA à -1, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30 et 60 minutes après le début de la perfusion à 3 jours et à -1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30, 60 et 120 minutes après le début de la perfusion à 130 et 360 jours. A chaque prélèvement, la glycémie a été mesurée immédiatement avec un glycomètre et les échantillons de plasma ont été conservés à -20°C jusqu'au dosage de l'insuline. J'ai souvent participé à ces tests, mais une grande partie a été réalisée par les techniciens des deux stations, souvent aidés par des stagiaires (BTS, DUT, vétérinaires) présents sur le terrain.

Après normalisation des données de glycémie et d'insulinémie par rapport aux valeurs à -1 minute, les aires sous courbes des réponses glycémiques et insulinémiques ont été calculées avec la méthode des trapèzes sur toute la période de prélèvement (61 minutes à 3 jours et 121 minutes à 360 jours). J'ai réalisé l'ensemble de ces analyses.

### 2.1.5.3. Clamps hyperinsulinémiques euglycémiques (HE)

Le clamp HE est considéré comme la méthode la plus précise (« *gold standard method* ») de mesure de la sensibilité à l'insuline *in vivo* (DeFronzo et al, 1979). Il a été adapté à l'espèce équine en 2003 (Rijnen et van der Kolk, 2003). Le principe de la technique du clamp HE est de maintenir le sujet dans un état hyperinsulinémique et de perfuser du glucose afin de maintenir une normoglycémie de valeur constante. A perfusion d'insuline



constante, le débit de perfusion du glucose reflète la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires et adipeuses.

Des clamps HE ont été réalisés à 200 et 540 jours sur tous les poulains. Après un jeûne d'une nuit, une perfusion dans la veine jugulaire gauche de 2,5 minutes d'une première dose de 45 mU d'insuline/kg (insuline recombinante humaine, Actrapid, Novo Nordisk, Danemark) a été utilisée pour provoquer une hyperinsulinémie. Immédiatement après, une perfusion de 6 mU d'insuline/kg/min a été commencée et l'hyperinsulinémie a été maintenue jusqu'à la fin de la procédure. Simultanément, une perfusion de 8,6  $\mu$ mol de glucose/kg/min a été démarrée par la même voie. La glycémie a été mesurée toutes les 10 minutes *via* un cathéter placé dans la veine jugulaire droite et le débit la perfusion de glucose a été ajusté afin de maintenir une normoglycémie (entre 4,4 et 6,7 mmol/L) pendant un minimum de 40 minutes. J'ai réalisé tous les clamps des poulains du modèle 1 avec M. Dubois et M. Bellonie et j'ai été relayée par Mlle Houdard pour les clamps des poulains du modèle 2 dans le cadre de sa thèse vétérinaire.

Le taux de métabolisme du glucose (M) a été calculé de la façon suivante :  $M \text{ (mmol/kg/min)} = \text{INF (mmol/kg/min)} - \text{SC (mmol/kg/min)}$ , où INF est le débit de perfusion du glucose et SC un facteur de correction calculé de la façon suivante :  $\text{SC (mmol/kg/min)} = (G2 - G1) \times 0,019$ , où G1 et G2 sont les valeurs de la glycémie au début et à la fin de chaque période de 10 minutes. J'ai réalisé l'ensemble de ces analyses.

## 2.1.6. Statut ostéoarticulaire des poulains

### 2.1.6.1. Recherche radiographique des lésions d'ostéochondrose

L'ostéochondrose est une affection dynamique qui ne se stabilise pas avant l'âge de 1 an (§1.2.2.1.2) (Jacquet et al, 2013). C'est pourquoi 8 clichés radiographiques ont été réalisés à 6 et 18 mois chez tous les poulains : une vue latéro-médiale de chaque boulet, une vue latéro-médiale et une vue oblique plantaro-latérale/dorso-médiale de chaque jarret et une vue latéro-médiale de chaque grasset. Les radiographies ont été réalisées en 2011 par les Dr. Aufils et Heng de la clinique vétérinaire de Pompadour et par les Dr. Levy et Dominici de la clinique vétérinaire de la Nouvetière à Sonzay et, à partir de 2012, elles ont été réalisées par l'équipe du Pr. Serteyn du Centre Européen du Cheval à Mont-le-Soie et interprétées par le Dr. Lejeune avec l'aide de M. Mendoza dans le cadre de sa thèse de sciences en 2013 et 2014 et de Mlle Martin dans le cadre de sa thèse vétérinaire en 2013.

### 2.1.6.2. Lecture des clichés radiographiques

Chaque cliché a été interprété en aveugle selon la méthode précédemment développée par Denoix et ses collègues (Denoix, 1990; Denoix et al, 2013). Le diagnostic



radiographique d'ostéochondrose est basé sur l'observation d'un kyste osseux sous-chondral, d'un fragment ostéochondral, d'une modification ou d'irrégularités du profil de la surface de l'os sous-chondral due à un défaut d'ossification (et non à un traumatisme). L'aspect proximo-dorsal de la crête sagittale du métacarpien/tarsien III, l'aspect distal de la lèvre latérale de la trochlée du talus, l'aspect proximal de la lèvre médiale de la trochlée du talus, de la crête intermédiaire distale du tibia et des lèvres latérale et médiale du fémur sont examinés.

#### **2.1.6.3. Classification des images radiographiques et attribution des scores**

Les images radiographiques ont été caractérisées selon une classification adaptée aux besoins de l'étude (Denoix et al, 1997). Elles pouvaient être normales, radiologiquement suspectes (IRS) ou radiologiquement anormales (IRA). Selon l'expression clinique présumée des anomalies, les IRA ont été classées en IRA à expression clinique incertaine (IRAi), probable (IRAp) ou certaine (IRAc). Une note dépendant de la sévérité des lésions a été attribuée à chaque cliché (IRS = 1, IRAi = 2, IRAp = 4, IRAc = 8), la somme des notes obtenues par un individu correspondant à son score radiographique d'ostéochondrose.

#### **2.1.6.4. Dosage des marqueurs biochimiques sériques du turnover osseux**

Dans cette thèse, quatre marqueurs sanguins du turnover osseux ont été analysés (§1.2.2.3). L'ostéocalcine, l'isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline, l'hydroxyproline et le CTX-II ont été dosés à 3, 140 et 180 jours, chez tous les poulains et à 360 jours chez les poulains du modèle 1. J'ai réalisé ces dosages au laboratoire Frank Duncombe à Caen, sous la responsabilité du Dr. Richard et de Mme Toquet qui ont fourni tout le matériel nécessaire. L'ostéocalcine et le CTX-II ont été dosés avec des kits ELISA commerciaux (AC-11F1 et AC-08F1, Immunodiagnostic Systems, France), la concentration sérique en PAL<sub>o</sub> a été déterminée par électrophorèse avec un kit commercial (Hydragel 7 & 15 ISO-PAL, SEBIA, France) et la concentration sérique en hydroxyproline a été mesurée à l'aide d'un dosage colorimétrique adapté par le laboratoire (Jaeschke, 1975; Valette et al, 2007).



## **2.2. Article: “Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses”**

**Peugnet P**, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, Dahirel M, Dubois C, Jouneau L, Reigner F, Berthelot V, Chaffaux S, Tarrade A, SerTEYN D, Chavatte-Palmer P

*PLoS ONE 2014;9(7):e102044.*







# Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer into Smaller or Larger Breeds Alters Post-Natal Growth and Metabolism in Pre-Weaning Horses

Pauline Peugnet<sup>1,2</sup>, Laurence Wimel<sup>3</sup>, Guy Duchamp<sup>4</sup>, Charlotte Sandersen<sup>5</sup>, Sylvaine Camous<sup>1,2</sup>, Daniel Guillaume<sup>6,7,8,9</sup>, Michèle Dahirel<sup>1,2</sup>, Cédric Dubois<sup>3</sup>, Luc Jouneau<sup>1,2</sup>, Fabrice Reigner<sup>4</sup>, Valérie Berthelot<sup>10,11</sup>, Stéphane Chaffaux<sup>1,2</sup>, Anne Tarrade<sup>1,2</sup>, Didier Sertheyn<sup>5</sup>, Pascale Chavatte-Palmer<sup>1,2\*</sup>

**1** INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas, France, **2** ENVA, Maisons Alfort, France, **3** IFCE, Station Expérimentale de la Valade, Chamberet, France, **4** INRA, UE1293, Nouzilly, France, **5** Clinique équine, Faculté de Médecine Vétérinaire, CORD, Université de Liège, Liège, Belgique, **6** INRA, UMR85, Physiologie de la Reproduction et Comportements, Nouzilly, France, **7** CNRS, UMR7247, Nouzilly, France, **8** Université François Rabelais de Tours, Tours, France, **9** IFCE, Nouzilly, France, **10** INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, Paris, France, **11** AgroParis Tech, Paris, France

## Abstract

In equids, placentation is diffuse and nutrient supply to the fetus is determined by uterine size. This correlates with maternal size and affects intra-uterine development and subsequent post-natal growth, as well as insulin sensitivity in the newborn. Long-term effects remain to be described. In this study, fetal growth was enhanced or restricted through ET using pony (P), saddlebred (S) and draft (D) horses. Control P-P (n = 21) and S-S (n = 28) pregnancies were obtained by AI. Enhanced and restricted pregnancies were obtained by transferring P or S embryos into D mares (P-D, n = 6 and S-D, n = 8) or S embryos into P mares (S-P, n = 6), respectively. Control and experimental foals were raised by their dams and recipient mothers, respectively. Weight gain, growth hormones and glucose homeostasis were investigated in the foals from birth to weaning. Fetal growth was enhanced in P-D and these foals remained consistently heavier, with reduced T<sub>3</sub> concentrations until weaning compared to P-P. P-D had lower fasting glucose from days 30 to 200 and higher insulin secretion than P-P after IVGTT on day 3. Euglycemic clamps in the immediate post-weaning period revealed no difference in insulin sensitivity between P-D and P-P. Fetal growth was restricted in S-P and these foals remained consistently lighter until weaning compared to S-D, with elevated T<sub>3</sub> concentrations in the newborn compared to S-S. S-P exhibited higher fasting glycemia than S-S and S-D from days 30 to 200. They had higher maximum increment in plasma glucose than S-D after IVGTT on day 3 and clamps on day 200 demonstrated higher insulin sensitivity compared to S-D. Neither the restricted nor the enhanced fetal environment affected IGF-1 concentrations. Thus, enhanced and restricted fetal and post-natal environments had combined effects that persisted until weaning. They induced different adaptive responses in post-natal glucose metabolism: an early insulin-resistance was induced in enhanced P-D, while S-P developed increased insulin sensitivity.

**Citation:** Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, et al. (2014) Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer into Smaller or Larger Breeds Alters Post-Natal Growth and Metabolism in Pre-Weaning Horses. PLoS ONE 9(7): e102044. doi:10.1371/journal.pone.0102044

**Editor:** Elissa Z. Cameron, University of Tasmania, Australia

**Received:** February 13, 2014; **Accepted:** June 15, 2014; **Published:** July 9, 2014

**Copyright:** © 2014 Peugnet et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was funded through a grant from the Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE) under the grant name "FOETALIM" and through funding from INRA Dept of Physiology and Breeding Systems. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Co-author Pascale Chavatte-Palmer is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* Email: pascale.chavatte@jouy.inra.fr

## Introduction

Epidemiological studies in humans have linked early-life events with a range of pathologies in adulthood. The first evidence of this was provided by the Hertfordshire's cohort in which people who had a small birth weight (reflecting suboptimal fetal development) were at greater risk of developing coronary heart disease, hypertension or type II diabetes in later life [1–3]. Maternal nutrition was pointed out as the primary factor affecting fetal development: in investigations of individuals who were exposed *in utero* to the Dutch Famine during World War II. It was shown that they were prone to a higher risk of developing obesity, glucose intolerance, hypertension or cardiovascular diseases in adult life

[4,5]. Rapid post-natal catch-up growth was also shown to increase the risk of later obesity as a result of a mismatch between the restricted *in utero* conditions to which the fetus had adapted and post-natal abundance [6]. In contrast, excess birthweight also leads to adverse programming, with a U-shaped curve for increased risks [7].

Experiments aimed at compromising fetal and neonatal development in animal models have confirmed that *in utero* and neonatal developmental conditions impact an individual's risk of developing metabolic diseases as an adult [8]. Indeed, intra-uterine growth retardation (IUGR) may lead to a post-natal increase in blood pressure and glucose intolerance [9] and may affect pancreatic islet function [10], the renin-angiotensin system [11]

and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis [12], depending on the individual's genotype and sex [13,14], as well as on the timing and intensity of the perturbation [15].

In production animals, the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) are of interest for their role in programming characteristics linked to commercial benefits, such as offspring survival, growth rate, body composition, fleece, milk and meat qualities and reproductive function [16,17]. Alterations in the fetal environment could also limit future health and athletic performance of the horse [18]. IUGR in equids has been reported to induce various detrimental effects in newborn foals and older horses, affecting the pulmonary microstructure balance, the respiratory function efficiency, the development of neuropathies or hyperlipidemia, as well as muscle and skeleton development and function [19]. Recently, an epidemiological study performed in Belgium underlined the detrimental effect of feeding pregnant mares with concentrates on the post-natal development of osteochondrosis lesions in their offspring [20]. These factors moderate the importance of genetics and post-natal life environment, highlighting the role of early developmental events in later athletic capacities in the horse. Early impacts on energy homeostasis in horses, although still unclear, are also of strong interest, since insulin resistance is involved in various pathologies of the adult horse such as Cushing's syndrome, laminitis, type II diabetes, hyperlipidemia, endotoxemia or osteochondrosis, as well as the equine metabolic syndrome [21,22]. Moreover, obesity in adult mares has been linked to reduced reproductive performance [23].

In horses, placentation is epitheliochorial and occurs over the entire surface of the endometrium. Thus, the nutritional supply to the fetus, which depends on the contact surface between the placenta and the endometrium, is governed by the size of the uterus and therefore by the mare's size. Based on this observation, the impact of early life events on intra-uterine and post-natal development of the foals was demonstrated using artificial insemination to cross large Shire horses with small Shetland ponies [24]. More recently, Allen and his colleagues used embryo transfers between small and large breeds of *equidae* (ponies and thoroughbreds) as a model for fetal programming, restricting or enhancing fetal growth by transferring thoroughbred embryos into pony mares and pony embryos into thoroughbred mares, respectively. Fetal development was related to maternal size, with the gross placental area, weight and microcotyledonary density being the primary operative control mechanisms [25]. Increased or restricted post-natal growth of foals born to between-breeds embryo transfers were also associated with altered blood pressure and response of catecholamine to acute stress [26] and altered pancreatic  $\beta$  cell function [27] in the immediate neonatal period (first week after birth).

The long term effects of these transfers on daily weight gain, glucose homeostasis and endocrine factors involved in growth remain unknown. Moreover, in embryo transfer practice, recipient mares are used which may not be the same size and breed as the embryo. This may lead to physiological adaptations that could affect offspring's pre- and post-natal development. The objectives of this work were to revisit Allen *et al's* study and explore long term metabolic effects on offspring. Fetal growth was increased by transferring pony and saddlebred embryos into draft mares and restricted by transferring saddlebred embryos into pony mares. Foals were monitored from birth to weaning for weight gain, glucose homeostasis and endocrine factors involved in both growth and energy regulation.

## Materials and Methods

The animal studies were approved by the local animal care and use committee ("Comité des Utilisateurs de la Station Expérimentale de Chamberet") and received ethical approval from the local ethics committee ("Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale du Limousin") under protocol number 5-2013-5.

The study was conducted over 2 successive breeding seasons (foaling in 2011 and 2012). Pony mares ( $n = 27$ ) were located at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) experimental farm in Nouzilly, France (farm 1, altitude 120 m). Pony embryos ( $n = 61$ ) were produced in the same location. Saddlebred ( $n = 28$ ) and draft ( $n = 14$ ) mares were located at the Institut Français du Cheval et de l'Équitation (IFCE) experimental farm in Chamberet, France (farm 2, altitude 470 m). Saddlebred embryos ( $n = 48$ ) were produced in the same location. Median mares' age was 6.9 years (range 3 to 19 years) and the herd included primiparous or multiparous mares (up to 10 gestations). With a median age of 4 years [3–5], draft mares were significantly younger than pony and saddlebred mares (9 years [5–10] and 7 years [4–13], respectively;  $p < 0.000$  with the Kruskal-Wallis test). With a median parity of 2 foals [1–4], saddlebred mares had significantly higher parity than pony and draft mares (1 foal [1–2] for both breeds,  $p = 0.007$  with the Kruskal-Wallis test). For the whole experiment, 1 pony stallion and 2 saddlebred stallions of the same breed and size (1.6 m at withers) were used. The experimental protocol used to produce foals is described in Figure 1.

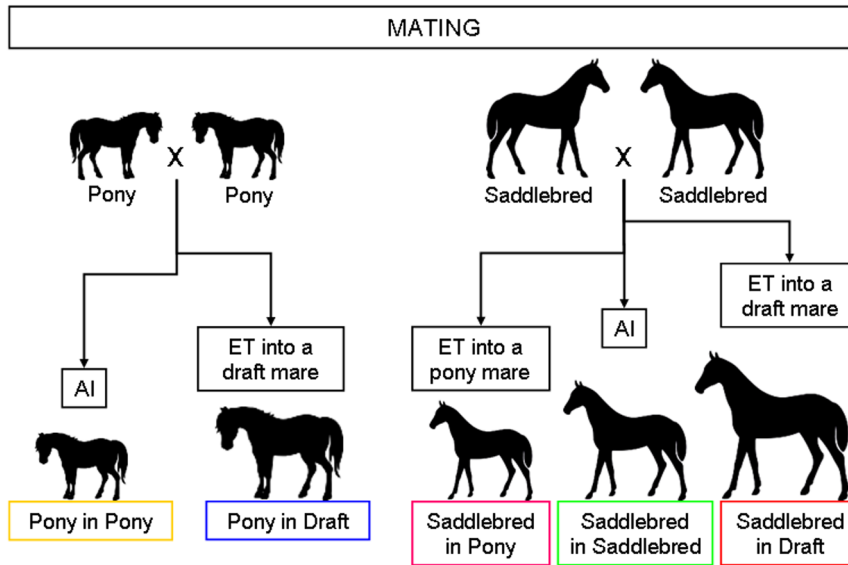
### Control pregnancies: within-breed artificial insemination (AI)

The number of animals and their use over the two experimental years are described in Table 1.

Pony-in-Pony (P-P) and Saddlebred-in-Saddlebred (S-S) pregnancies were obtained by artificial insemination using semen from 1 pony and 2 saddlebred stallions, respectively. Follicular growth and ovulation were monitored by transrectal ultrasonography in order to determine the timing of insemination. Pregnancy was checked 14 days after ovulation by transrectal ultrasonography.

### Experimental pregnancies: between-breed embryo transfer (ET)

Pony-in-Draft (P-D), Saddlebred-in-Pony (S-P) and Saddlebred-in-Draft (S-D) pregnancies were obtained as described below. Embryo donors (pony and saddlebred mares) and recipients (pony and draft mares) cycles were synchronized with an intramuscular injection of prostaglandin analogue (0.125 mg Estrumate (MSD Santé Animale, Beaurouzé, France) for pony mares; 7.5 mg Prostaglandin (Virbac) for saddlebred and draft mares) to induce luteolysis. Donors and recipients were subsequently given 15 mg crude equine gonadotropin (pony mares) or 750 IU Chorulon (MSD Santé Animale) (saddlebred and draft mares) intravenously to induce ovulation and donors were artificially inseminated. The donors' uteri were flushed 3 times with one liter of Ringer lactate solution 7 days after ovulation. Recovered embryos were washed 10 times in Emcare Holding solution (ICP bio), transported in an Equitainer (Hamilton Research) to the other experimental farm (3–4 hours) and immediately transferred non-surgically into synchronized recipients 5 to 7 days post-ovulation. Pregnancy was diagnosed by ultrasound 7 days after transfer (corresponding to a 14-day pregnancy).



**Figure 1. Establishment of control and experimental pregnancies by artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET), respectively.**

doi:10.1371/journal.pone.0102044.g001

**Nutrition and general care**

From the day of ovulation, grazing was available 24 h/day with free access to water and mineral salts for all pregnant mares. From the 5<sup>th</sup> gestational month (November, fall), they were housed in boxes and fed a diet based on straw and hay complemented with concentrates (soybean or commercial pellets (Eperon, Tellus Nutrition Animale, France) on farm 1 and either homemade pellets containing barley, soybean cake, molasses and minerals and vitamins, or moha hay on farm 2) with free access to water and mineral salts. The quality of feedstuff was measured for each new batch and is detailed in Table S1.

All foals were born during spring and summer (range April 6<sup>th</sup>–August 13<sup>th</sup>) with the majority (>75%) being born in May and June. Mares and foals returned to grazing 10 and 3 days after foaling, respectively on farms 1 and 2. At each farm, fillies and colts were raised in one group in the same pasture until weaning at 180 days of age. From weaning, foals were housed in open barns and fed a diet based on straw and hay complemented with concentrates commercial pellets (Eperon, Tellus Nutrition Animale) on farm 1 and homemade pellets containing barley, soybean cake, molasses and minerals and vitamins on farm 2 (Table S1). Horses had free access to water on both farms and free access to mineral salts on farm 1. The foals were vaccinated and dewormed as for standard care.

**Body condition and weight gain monitoring and blood sampling in mares and foals**

Mares were weighed and scored for body condition (Body Condition Score – BCS - scale 1 to 5 [28]) every 2 months from the 5<sup>th</sup> gestational month (when mares were housed in boxes), on day 1 post foaling and then monthly. The same person performed all BCS within each farm. Blood samples were collected on EDTA from the jugular vein at the same time of the day (9–10 AM) to measure plasma concentrations of non esterified fatty acids (NEFA) and leptin every 2 months from the 5<sup>th</sup> gestational month, on day 1 post foaling and then every two months. Due to a technical problem, samples could not be obtained from all mares at 5 and 6 months, and thus some comparisons could not be performed at these stages. Foals were weighed on the morning following birth, at 2 weeks of age and then monthly after foaling. Blood samples were collected on EDTA from the jugular vein before first suckling, at 3 and 30 days of age after 4 h fasting, then monthly until 180 days of age after 6 h fasting and at 200 days of age after overnight fasting. Fasting glucose was measured at the same time at 3, 30, 90, 140, 180 and 200 days of age using an automated analyzer (Medisense Optium Xceed, Abbott, Illinois, USA).

**Table 1. Number of recipient and control mares and foals with sex ratio within the five groups.**

		P-P	P-D	S-P	S-S	S-D
<b>Number of mares and foals</b>	<b>2011</b>	10	5	2	18	8
	<b>2012</b>	11	1	4	10	0
	<b>Total</b>	21	6	6	28	8
<b>Number of females/number of males</b>		12/9	4/2	2/4	16/12	6/2

All mares were pregnant and delivered one foal, so mare numbers are the same as foal numbers.  
 (P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft).  
 doi:10.1371/journal.pone.0102044.t001

### Intravenous glucose tolerance test (IVGTT) in foals at 3 days of age

**Experimental procedure.** Foals were muzzled to prevent them from suckling 4 h before the procedure. Just before starting the test, a catheter (14G, Introcan-W Certo, BBraun, Melsungen, Germany) with an extension tube was placed in the left jugular vein. Foals were infused intravenously with glucose (0.25 g/kg, 30% glucose, BBraun) over 1 min through this catheter. Blood samples were collected on EDTA from the right jugular vein at –1 min and 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30 and 60 min after glucose infusion for immediate measurement of glycemia using an automated analyzer (Medisense Optium Xceed). Blood samples were centrifuged at 3,500 g for 10 min and plasma was separated and stored frozen at –20°C until insulin assay.

**Calculations.** The areas under the glucose and insulin response curves (AUC) were calculated with the trapezoidal method, reflecting the integrated plasma concentration after glucose administration from –1 to 60 min above the pre-infusion baseline for all positive values. Maximum plasma glucose and insulin increments at each time point and AUC for insulin and glucose were compared.

### Hyperinsulinemic euglycemic clamp in foals at 200 days of age

**Experimental procedure.** The procedure reported below is adapted from previous published work [29]. One catheter (14G, Introcan-W Certo, BBraun) was placed in each jugular vein after feed had been withheld for 12 h. One of the catheters was used for infusion of 30% glucose and insulin (recombinant human insulin, Actrapid, 100 IU/mL, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) and the other one for blood sampling. A priming dose of 45 mU of insulin/kg diluted in 0.9% sodium chloride (Aguettant, Lyon, France) was given intravenously within 2.5 min to induce hyperinsulinemia. Immediately after the administration of the insulin priming dose, insulin infusion was started with a constant infusion rate of 6 mU/kg/min. Glucose infusion was started simultaneously with an infusion rate of 8.6  $\mu$ mol/kg/min. During the insulin and glucose infusions, glycemia was measured every 10 min using the same automated analyzer as described above. The glucose infusion rate was adjusted when the preceding glycemia value differed from the euglycemic concentration (range 4.4 to 6.7 mmol/L) until a steady state was obtained. The steady state was maintained for at least 40 min and 3 blood samples were collected on EDTA (at the beginning, middle and end of the steady state), centrifuged at 3,500 g for 10 min and plasma was separated and stored at –20°C until insulin assay.

**Calculations.** The glucose metabolism rate was calculated as follows:  $M$  (mmol/kg/min) =  $INF$  (mmol/kg/min) –  $SC$  (mmol/kg/min), where  $M$  is the glucose metabolism rate,  $INF$  is the glucose infusion rate and  $SC$  is the space correction factor. The  $SC$  was calculated as follows:  $SC$  (mmol/kg/min) =  $(G_2 - G_1) \times 0.019$ , where  $G_1$  and  $G_2$  are the glycemia values before and after each 10-min period.

### Plasma leptin analysis

Mare's plasma leptin concentrations were measured in duplicate with a homologous double-antibody RIA developed in our laboratory [30] with some modifications. The primary antibody was obtained from goats immunized against recombinant equine leptin (a gift from A. Gertler, the Hebrew University, Rehovot, Israel). Standards (0.75 to 40 ng recombinant equine leptin/mL) and samples (aliquots of 100  $\mu$ L) diluted to 350  $\mu$ L in PABET (Protein Assay Buffer with EDTA and Tween 20) pH 7.2 were

incubated for 24 h at room temperature (RT) with equine leptin antiserum (50  $\mu$ L at 1:3,000 initial dilution). After the initial incubation, 100  $\mu$ L of  $^{125}$ I- equine leptin (diluted in the same buffer without EDTA) were added to each tube and the incubation continued at RT. After approximately 24 h the tubes were placed at 4°C until the end of the assay the next day. The antigen-antibody complex was precipitated following a 35-min RT incubation with 100  $\mu$ L of a rabbit anti-goat antiserum and by centrifugation at 2,700 g for 35 min. The limit of detection was 1.0 ng/ml. Intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 10% and 10–13%, respectively.

### Plasma NEFA analysis

Mare plasma NEFA concentrations were measured in duplicate with an enzymatic-colorimetric method using a Cobas Mira-analyzer (Roche, Mannheim, Germany) with a commercial kit for NEFA (NEFA-HR(2), Wako Chemical GmbH, Neuss, Germany). The minimum level of detection was 10  $\mu$ mol/L. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.7% and 4.5%, respectively.

### Plasma IGF-1, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> analyses

Foal fasting plasma IGF-1, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> concentrations were measured in duplicate with commercial RIA kits (IGF-1-RIACT, OCPE07-T3 and OCPG07-T4, CISbio International, Gif sur Yvette, France) validated for use in horses. The minimum levels of detection were 1.0 ng/mL, 0.1 ng/mL and 2.5 ng/mL, respectively for plasma IGF-1, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 3.5% and 6.0% for plasma IGF-1, 7.8% and 8.2% for plasma T<sub>3</sub> and 4.7% and 8.0% for plasma T<sub>4</sub>, respectively.

### Plasma insulin analysis

Foal fasting and post-bolus plasma insulin concentrations were measured in duplicate with a double antibody RIA as previously described. The minimum level of detection was 0.1 pg/mL and the intra-assay coefficients of variation were 7.2% and 5.8%, respectively.

### Statistical analysis

All results are expressed as median [quartile 1 - quartile 3] and are presented as curves (median and interquartile range) or boxplots (minimum to maximum). Most values are presented in Table S2 for mare parameters and in Table S3 for foal parameters. Statistical analysis were carried out using R software ([www.r-project.org/](http://www.r-project.org/), version i386 2.15.2).

Analyses on mares were performed in two stages: 1) the effect of the maternal breed and 2) the effect of embryo transfer were studied. Mare parameters (body weight, body score, NEFA and leptin) were analyzed at each time point using the coin plug-in for Rcmdr [31] with the Kruskal-Wallis test followed by the NDWD *post-hoc* test for question 1 (pony *vs* saddlebred *vs* draft mares) and with the Mann-Whitney rank sum test for question 2 (P-P *vs* S-P and P-D *vs* S-D).

Three factors of variation were successively analyzed in foals: 1) breed effect (pony *vs* saddlebred controls), 2) effect of increased fetal growth in ponies and 3) either restricted or increased fetal growth in saddlebred foals. Non repeated measures were analyzed using the coin plug-in for Rcmdr with the Mann-Whitney rank sum test for question 1 (P-P *vs* S-S) and 2 (P-D *vs* P-P) and with the Kruskal-Wallis test followed by the NDWD *post-hoc* test for question 3 (S-P *vs* S-S *vs* S-D) [32]. Repeated measures were first analyzed using the F1 LD F1 model of the nparLD function to calculate an ANOVA-type statistic followed by paired comparison

to answer the question of a group effect for each pair of groups [32]. Data were then analyzed at each time point with the Mann-Whitney rank sum test for question 1 (P-P *vs* S-S) and 2 (P-D *vs* P-P) and with the Kruskal-Wallis test followed by the NDWD *post-hoc* test for question 3 (S-P *vs* S-S *vs* S-D). Sex-associated differences were also studied within each control groups with the Mann-Whitney rank sum test (males *vs* females).

Data were considered statistically significant for  $p < 0.05$ . P-values below 0.0005 are indicated as  $p < 0.000$ .

## Results

### Pregnancy and parturition outcomes

The number of foals and sex ratio within groups are shown in Table 1. Over the two breeding seasons (2011 and 2012), 21 P-P and 28 S-S control foals were born and 6 P-D, 6 S-P and 8 S-D experimental foals were obtained. All the mares delivered spontaneously at term. All the foals were healthy but 3 S-P foals (out of 6) exhibited signs of prematurity/dysmaturity [33] and needed assistance to stand and suckle for the first days after birth. Consequently, 3 S-P foals and their pony dams were not allowed to go to pasture before 30 days of age as their counterparts did. Six S-S foals died: 2 fillies and 3 colts died from diarrhea and 1 colt was euthanized because of septic arthritis in the first week after birth. One S-D foal was rejected by its draft dam and was bottle-fed until weaning. Data collected for these foals were however not discarded from further analysis because they were not identified as outliers for any studied parameter. All the foals were weaned at 180 days of age. Values for mares and foals parameters are shown in Table S2 and Table S3.

### Mares during gestation and lactation

**Body weight.** Mare body weights remained constant throughout gestation as illustrated in Figure 2A, with marked differences between breeds (median body weight 375.0 kg [319.5–406.3], 635.5 kg [589.2–671.8], and 827.7 kg [780.0–874.0] in pony, saddlebred and draft mares, respectively). Body weight decreased in all mares after foaling (−9.3%, −10.5% and −1.3% in pony, saddlebred and draft mares, respectively,  $p < 0.000$ ). Body weights remained stable thereafter until around 2 months *postpartum* when they gradually decreased until weaning at 6 months.

At the time of ET into ponies, when several recipients were available, the larger pony mare was selected as recipient in order to reduce putative problems linked to the foal's size at parturition. Indeed, pony mares pregnant with a saddlebred fetus were significantly heavier with larger withers' height compared to pony mares carrying pony pregnancies (body weight 402.5 kg [389.5–425.3] and 355.0 kg [298.5–398.8] ( $p < 0.000$ ) and withers' height 132.5 cm [129.8–136.0] and 126.5 cm [121.0–129.5] ( $p < 0.05$ ) in S-P and P-P mares, respectively).

**Body Condition Score (BCS).** BCS remained constant throughout gestation as illustrated in Figure 2B, with marked differences between obese pony mares (5.0 points [4.5–5.0]) and saddlebred and draft mares just above the superior limit for optimal body condition (3.75 points [3.25–4.0] and 3.75 points [3.5–4.0], respectively). Pony and saddlebred mares lost 0.5 and 0.4 point body score between the 11<sup>th</sup> month of gestation and day 1 *postpartum*, whereas body scores remained unchanged in draft mares. BCS continued to fall during lactation, the loss being higher in pony mares (−1.5 point) compared to saddlebred and draft mares (−0.75 and −0.5 points). At weaning on day 180 *postpartum*, pony and saddlebred mares were at the lower limit for what is considered the optimal body condition (2.5 points [2.5–

3.6] and 2.5 points [2.5–3.3]) whereas the draft mares' BCS had not really changed since the 5<sup>th</sup> gestational month (3.25 points [3.0–3.8]).

**Non Esterified Fatty Acids (NEFA).** Plasma NEFA concentrations reflect lipomobilization and increase in the case of negative energy balance. NEFA concentrations remained stable throughout gestation as illustrated in Figure 2C. There was no significant difference for NEFA between pony, saddlebred and draft mares on the 5<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> gestational months but NEFA concentrations were significantly higher in pony *vs* saddlebred ( $p < 0.05$ ) and draft mares ( $p < 0.000$ ). NEFA concentrations started to rise on the 9<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> month of gestation in pony mares and in saddlebred/draft mares, respectively. They reached their maximum 1 day after foaling in the 3 breeds. NEFA concentrations remained relatively stable throughout lactation, levels being significantly higher in pony mares at 5 months *postpartum* than in saddlebred mares at 6 months *postpartum* ( $p < 0.05$ ).

Pony and draft mares carrying saddlebred pregnancies tended to have higher NEFA concentrations at 5 months of gestation compared to pony and draft mares carrying pony pregnancies, respectively ( $p = 0.058$  and  $p = 0.057$ ). In contrast, after birth, pony mares suckling saddlebred foals had significantly lower plasma concentrations than those suckling control foals 5 months *postpartum* ( $p < 0.05$ ) but not before.

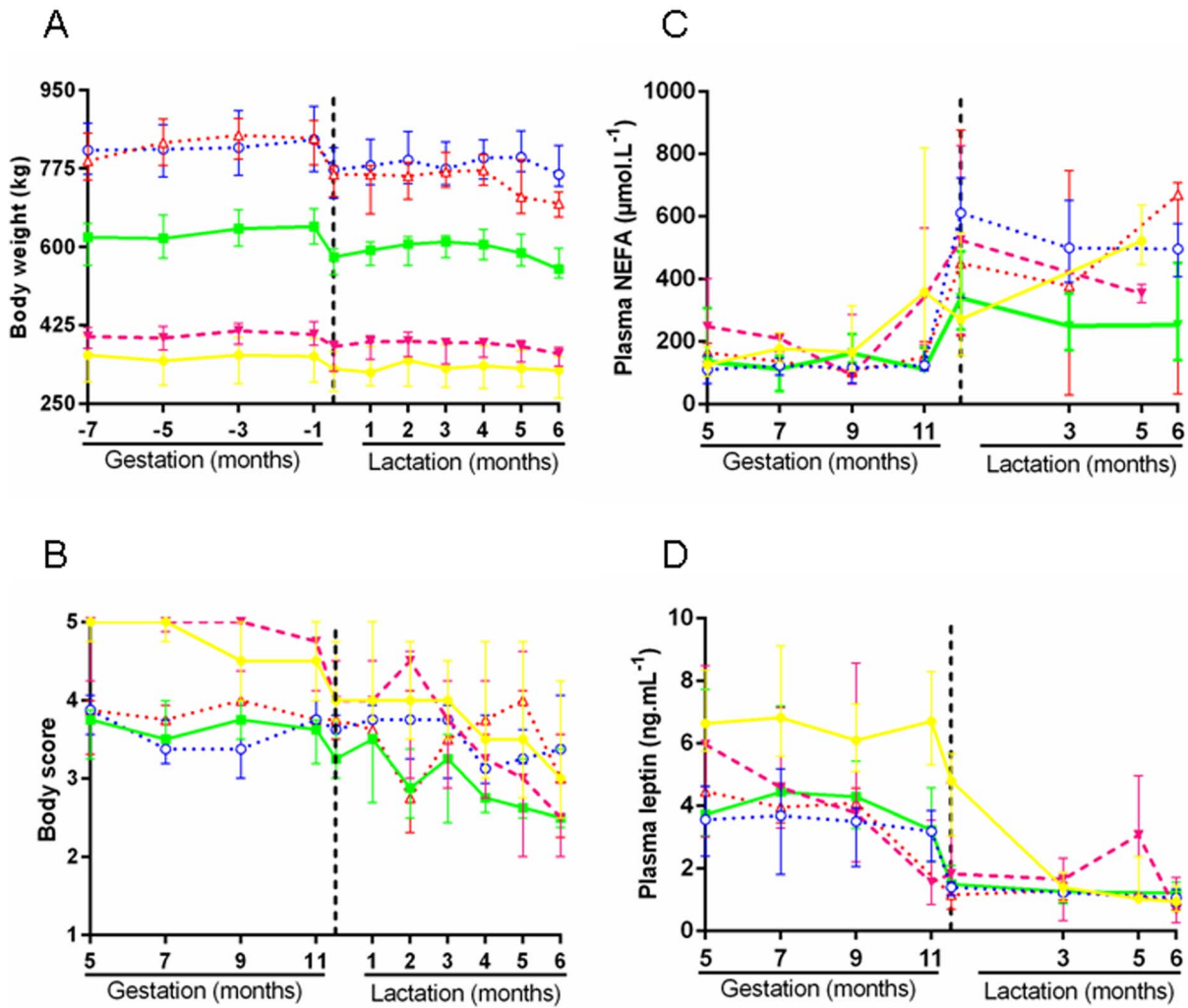
**Leptin.** Plasma leptin concentrations during pregnancy are illustrated in Figure 2D. Depending on times, they were significantly ( $p < 0.000$ ) or tended to be higher in pony *vs* saddlebred. They were significantly higher in pony *vs* draft mares ( $p < 0.000$ ) at all time points until parturition. Leptin remained stable after parturition, was low and not significantly different between breeds. Leptin concentrations fell from the 11<sup>th</sup> month of gestation in all mares except for the 3 groups of mares carrying saddlebred pregnancies where they started to decrease at 5 (S-P) or 9 (S-D, S-S) months of gestation. They reached their lowest concentration on day 1 *postpartum* except for control pony mares where lowest plasma concentrations were reached on day 90 *postpartum*.

### Breed effects in control foals (P-P *vs* S-S)

P-P and S-S pregnancies lasted 331.9 days [326.7–337.7], with no significant breed effect. At birth, P-P foals were significantly lighter than S-S foals (25.5 kg [22.5–32.0] *vs* 49.4 kg [43.9–55.4],  $p < 0.000$ ). These body weight differences were maintained until day 180 and confirmed at each time point (Figure 3A).

IGF-1 concentrations were strongly related to the foal's breed and were significantly higher in P-P *vs* S-S foals at all time points from birth to day 180 (significant group effect,  $p < 0.000$ ) (Figure 4A). A significant group effect was also observed for  $T_3$  concentrations ( $p < 0.000$ ).  $T_3$  concentrations were significantly lower at birth (Figure 5A) ( $p < 0.005$ ) but were significantly higher on days 3, 90 and 180 ( $p < 0.000$ ) in P-P *vs* S-S foals. No significant group effect was observed for  $T_4$  concentrations (Figure 6A) and, as a result,  $T_3/T_4$  ratio was significantly different between breeds ( $p < 0.000$ ).  $T_3/T_4$  ratio was significantly decreased at birth ( $p < 0.05$ ), unaffected on day 3 and significantly increased on days 90 and 180 in P-P *vs* S-S foals ( $p < 0.000$  and  $p < 0.005$ ).

Fasting glucose was also breed specific with a significant group effect ( $p < 0.000$ ). P-P foals had significantly higher fasting glucose than S-S foals, except on days 3 and 140 (Figure 7A). During IVGTT on day 3, plasma glucose AUC tended to be lower in P-P *vs* S-S foals (131.0 mmol/min/L [102.8–142.8] *vs* 160.0 mmol/min/L [112.3–196.6],  $p = 0.056$ ). Other parameters remained mainly unaffected (Figure 8). Clamps on day 200, however, highlighted breed specific glucose metabolism rates (M): glucose



**Figure 2. Mares' parameters from the 5<sup>th</sup> gestational month to weaning in the five groups.** **A:** body weight. **B:** body scores. **C:** plasma NEFA. **D:** plasma leptin. (P-P: Pony in Pony (●), P-D: Pony in Draft (○), S-P: Saddlebred in Pony (▼), S-S: Saddlebred in Saddlebred (■), S-D: Saddlebred in Draft (△)). Curves are presented as medians and interquartile ranges.  
doi:10.1371/journal.pone.0102044.g002

metabolism was significantly reduced in P-P *vs* S-S foals (0.013 mmol/kg/min [0.011–0.018] *vs* 0.020 mmol/kg/min [0.014–0.030],  $p < 0.001$ , Table S3), indicating increased insulin resistance in pony *vs* saddlebred foals.

### Sexual dimorphism in control foals

Data were analyzed for sexual dimorphism in 12 female *vs* 9 male control pony foals and in 16 *vs* 12 male control saddlebred foals. In both breeds, fillies and colts had similar gestational length and weight until 6 months of age. Saddlebred fillies had significantly higher IGF-1 concentrations on day 90 ( $p < 0.05$ ) and higher  $T_3$  concentrations on days 3 and 90 ( $p = 0 < 0.05$  for both) than saddlebred colts. In pony foals, significantly decreased  $T_4$  levels were observed in pony fillies *vs* colts on day 180 ( $p < 0.05$ ). There was a significant effect of the sex on fasting glucose in saddlebreds with increased concentrations in fillies *vs* colts on days 90 and 140 ( $p < 0.01$ ). In contrast, fasting glucose in pony foals remained unaffected by the sex. No significant sex effect was found for IVGTT and clamps in either of the two breeds. Because the sex ratio was unbalanced, sex specificities were not investigated within experimental groups.

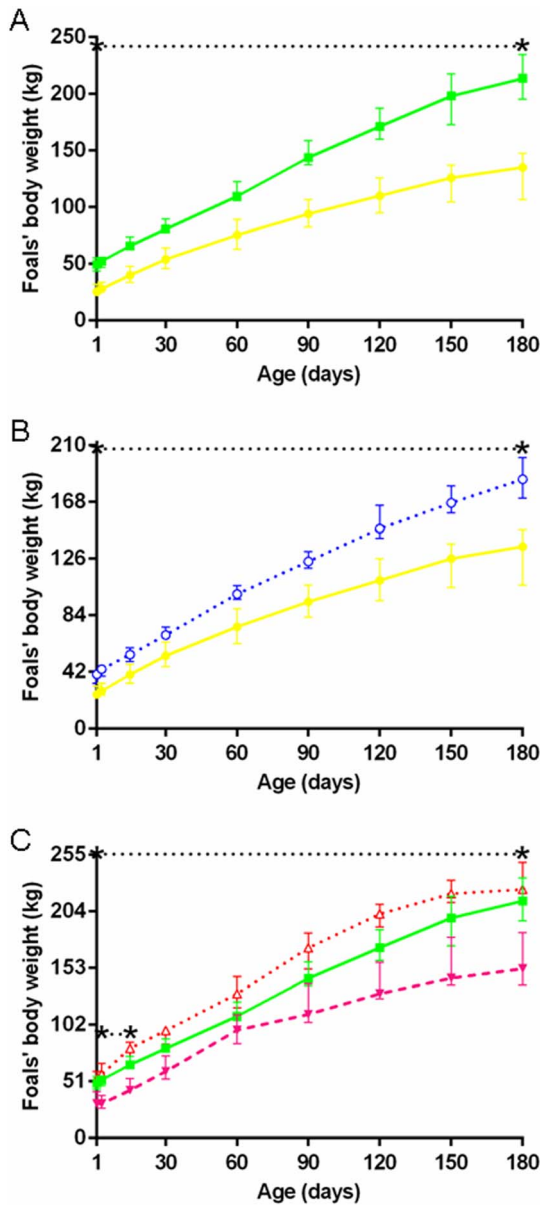
### Effect of increased fetal growth in pony foals

Although not significant when both breeding seasons were analyzed together, it should be noted that, in the first breeding season, P-D pregnancies (332.1 days [321.7–333.1]) were significantly shorter compared to P-P pregnancies (339.1 days [334.3–343.1],  $p < 0.05$ ). Altogether, P-D foals (40.1 [33.6–40.9] kg) had a significantly 57.3% increased birth weight ( $p < 0.000$ ) compared to P-P controls and remained significantly heavier until day 180 where they still had a significantly increased body weight (+37.0%,  $p < 0.000$ ) (Figure 3B).

IGF-1 concentrations remained unaffected by transfer into a draft mare except on day 3 where P-D foals had significantly higher plasma concentrations than P-P controls ( $p < 0.05$ ) (Figure 4B).  $T_3$  concentrations were significantly reduced in P-D *vs* P-P foals on days 3, 90 and 180 ( $p < 0.000$ ) (Figure 5B) whereas  $T_4$  concentrations were significantly reduced only on days 0 and 3 ( $p < 0.05$  and  $p < 0.000$ , respectively) (Figure 6B).  $T_3/T_4$  ratios were subsequently significantly increased on day 3 ( $p < 0.05$ ) and decreased on days 90 and 180 ( $p < 0.05$ ) in P-D *vs* P-P foals.

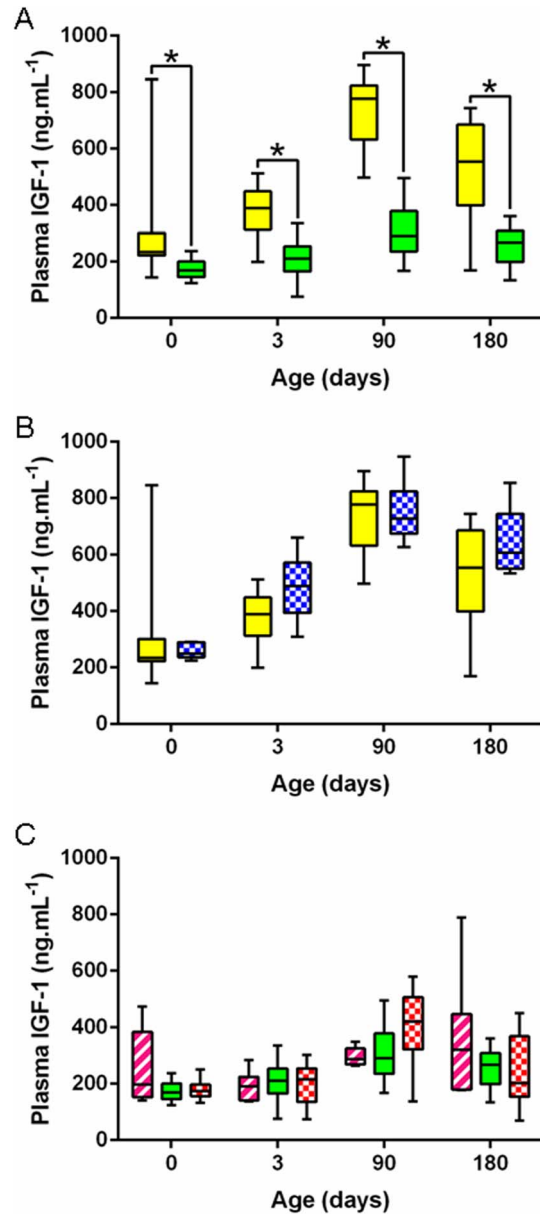
Fasting glucose was affected the same way, with significantly reduced plasma concentrations on days 30, 90 and 180 ( $p < 0.005$ )





**Figure 3. Foals' body weights from birth to weaning in the five groups.** **A:** P-P (●) vs S-S (■). **B:** P-P (●) vs P-D (○). **C:** S-P (▼) vs S-S (■) vs S-D (Δ) (P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft). Curves are presented as medians and interquartile ranges. The median values between the asterisks differ significantly from each other (F1-LD-F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ). In graph C, median values under the lower and upper dotted lines between asterisks significantly differ between S-P and S-S and between S-P and S-D, respectively. NB: Different scales were used for A, B and C in order to show the differences.  
doi:10.1371/journal.pone.0102044.g003

in P-D vs P-P foals (Figure 7B). No significant group effect was found on glucose parameters during IVGTT on day 3 (Figure 8) nor during clamps on day 200 (Table S3). P-D foals, however, had significantly higher insulin AUC ( $p < 0.05$ , Figure 8C2), higher plasma insulin increments at 3, 9, 30 and 60 minutes ( $p < 0.05$ , Figure 8A2), as well as higher maximal insulin increments ( $p < 0.05$ ) compared to P-P foals.



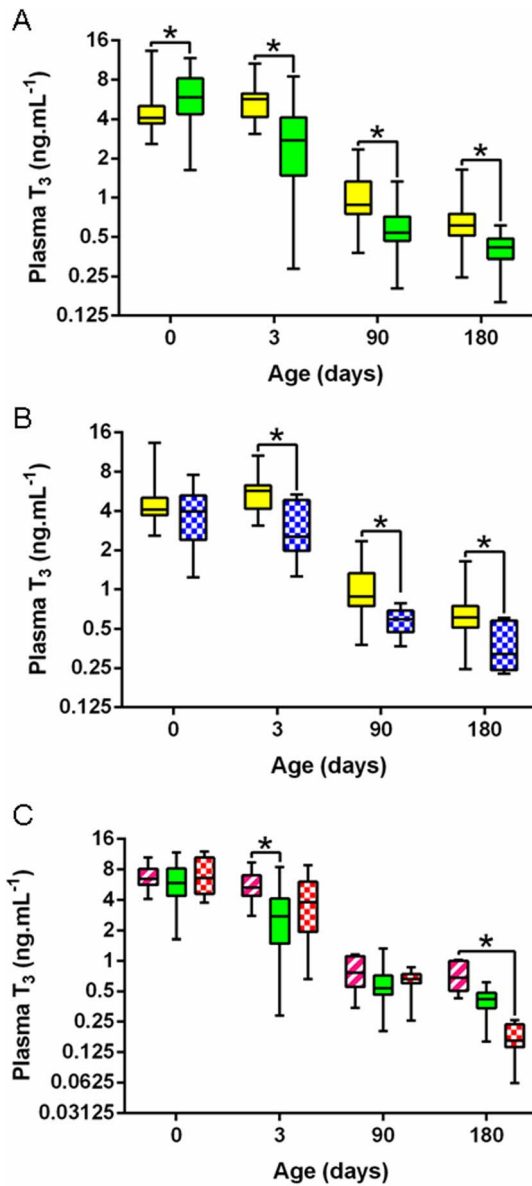
**Figure 4. Foals' plasma IGF-1 levels from birth to weaning in the five groups.** **A:** P-P (full yellow) vs S-S (full green). **B:** P-P (full yellow) vs P-D (chequered blue). **C:** S-P (striped pink) vs S-S (full green) vs S-D (chequered red) (P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft). Curves are presented as medians and interquartile ranges. The median values under the asterisks differ significantly from each other (F1-LD-F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ).  
doi:10.1371/journal.pone.0102044.g004

**Effect of increased or reduced fetal growth in saddlebred foals**

S-P pregnancies were significantly longer compared to S-S (344.0 days [334.5–353.8] vs 330.8 days [325.9–336.3], respectively,  $p = 0.05$ ) and S-D pregnancies (328.0 days [327.0–334.1],  $p < 0.05$ ) pregnancies. There was no significant difference in gestational length in S-D vs S-S.

Body weight in S-P, S-S and S-D foals are represented in Figure 3C. S-P foals (31.0 kg [28.0–41.5]) tended to be lighter at birth compared to S-S controls (−37.2%,  $p = 0.078$ ). They

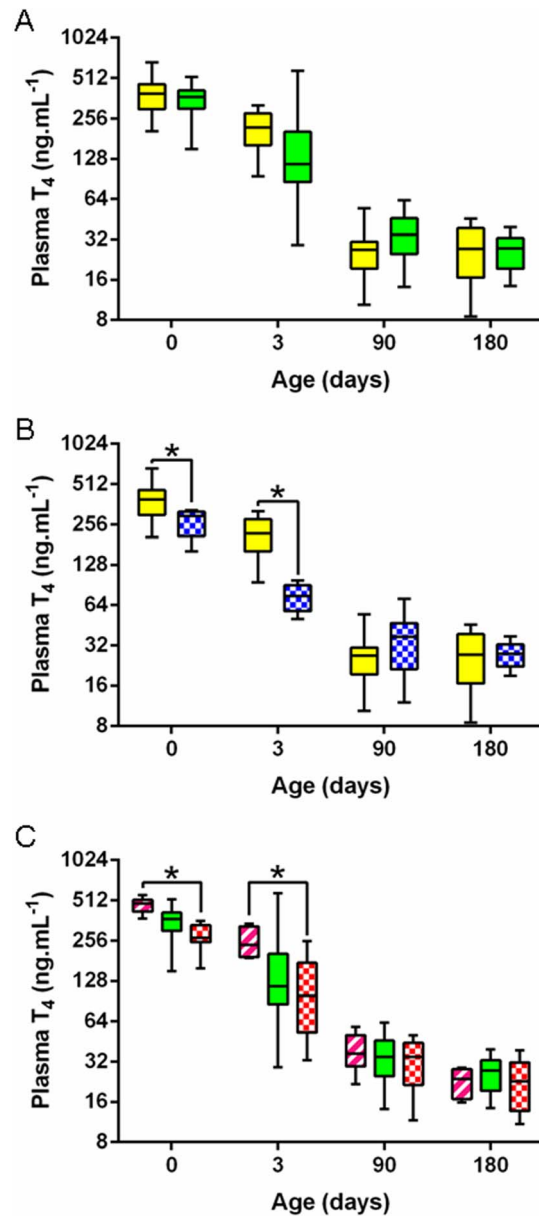




**Figure 5. Foals' plasma T<sub>3</sub> levels from birth to weaning in the five groups.** **A:** P-P (full yellow) vs S-S (full green). **B:** P-P (full yellow) vs P-D (chequered blue). **C:** S-P (striped pink) vs S-S (full green) vs S-D (chequered red) (P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft). Curves are presented as medians and interquartile ranges and the scale on the y-axis is semi-logarithmic. The median values under the asterisks differ significantly from each other (F1-LD-F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0102044.g005

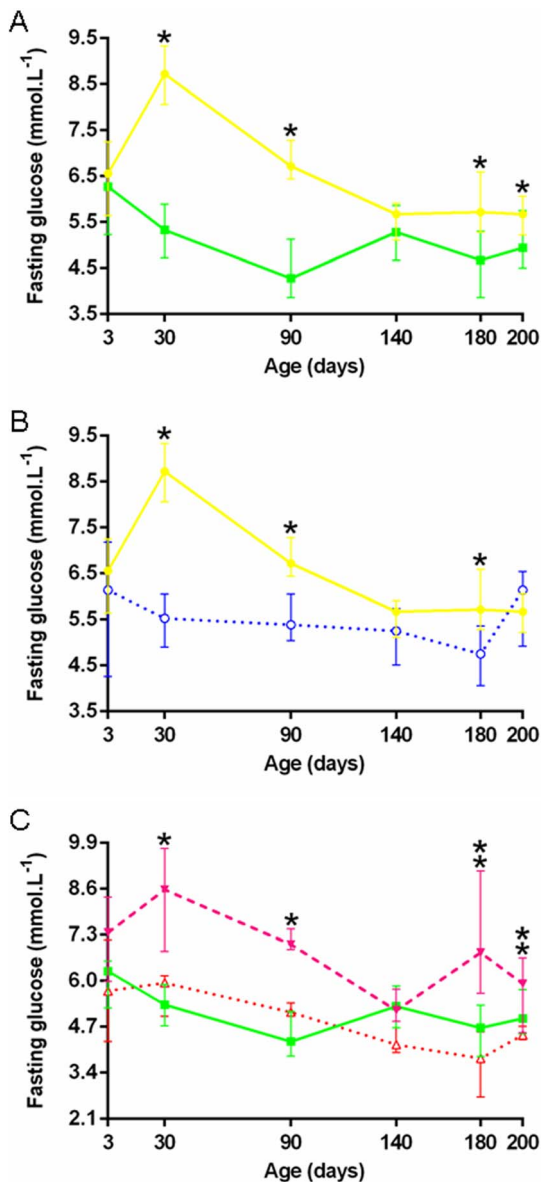
remained significantly lighter than S-S controls until day 30 ( $p < 0.000$ ) at which time the difference was no longer significant, although S-P bodyweight at 6 months of age was significantly less by 29% compared to S-S controls. S-P foals were also significantly lighter than S-D foals from birth to 180 days ( $p < 0.000$ ), with a significantly lighter birth weight ( $-42.3\%$ ,  $p < 0.000$ ). In contrast, the bodyweights of S-D foals were not significantly different compared to S-S controls.

IGF-1 concentrations in saddlebred foals were not affected by transfer into either a pony or a draft mare (Figure 4C). S-P foals



**Figure 6. Foals' plasma T<sub>4</sub> levels from birth to weaning in the five groups.** **A:** P-P (full yellow) vs S-S (full green). **B:** P-P (full yellow) vs P-D (chequered blue). **C:** S-P (striped pink) vs S-S (full green) vs S-D (chequered red) (P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft). Curves are presented as medians and interquartile ranges and the scale on the y-axis is semi-logarithmic. The median values under the asterisks differ significantly from each other (F1-LD-F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0102044.g006

only differed from S-S controls by elevated T<sub>3</sub> concentrations on day 3 ( $p < 0.05$ , Figure 5C). There was no difference between S-P and S-S foals for T<sub>4</sub> (Figure 6C) and T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> ratio. In contrast, T<sub>3</sub> concentrations were significantly increased on day 180 ( $p < 0.05$ ) and T<sub>4</sub> concentrations were significantly increased on days 0 and 3 ( $p < 0.000$  and  $p < 0.05$ ) in S-P vs S-D foals (Figures 5C and 6C), resulting in significantly higher T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> ratios on day 180 in S-P vs S-D foals ( $p < 0.000$ ). Saddlebred foals were not affected by transfer into a draft mare with no significant difference between S-D and S-S foals.



**Figure 7. Foals' fasting glucose from birth to weaning in the five groups. A:** P-P (●) vs S-S (■). **B:** P-P (●) vs P-D (○). **C:** S-P (▼) vs S-S (■) vs S-D (Δ) (P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft). Curves are presented as medians and interquartile ranges. The median values under the asterisks differ significantly from each other (F1-LD-F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ). In graph C, median values under the simple and double asterisks significantly differ between S-P and S-S and between S-P and S-D, respectively.  
doi:10.1371/journal.pone.0102044.g007

Fasting plasma glucose was significantly higher in S-P vs S-S foals on days 30 and 90 ( $p < 0.005$ ) and in S-P vs S-D foals on days 180 and 200 ( $p < 0.000$  and  $p < 0.05$ ) (Figure 7C). No significant group effect was found for plasma glucose AUC during IVGTT on day 3 but the maximal increment in glucose was significantly higher in S-P vs S-D foals (13.0 mmol/L [9.8–13.8] vs 8.3 mmol/L [6.9–11.3],  $p < 0.05$ , Figure 8B1). The maximum insulin increment tended to be reduced in S-P compared to S-D foals ( $p = 0.081$ ). Clamps demonstrated no difference in S-P vs S-S or in S-D vs S-S foals. But S-P and S-D differed from each other by

increased M in S-P on day 200 (0.025 mmol/kg/min [0.020–0.035] vs 0.016 mmol/kg/min [0.013–0.020],  $p < 0.05$ , Table S3).

## Discussion

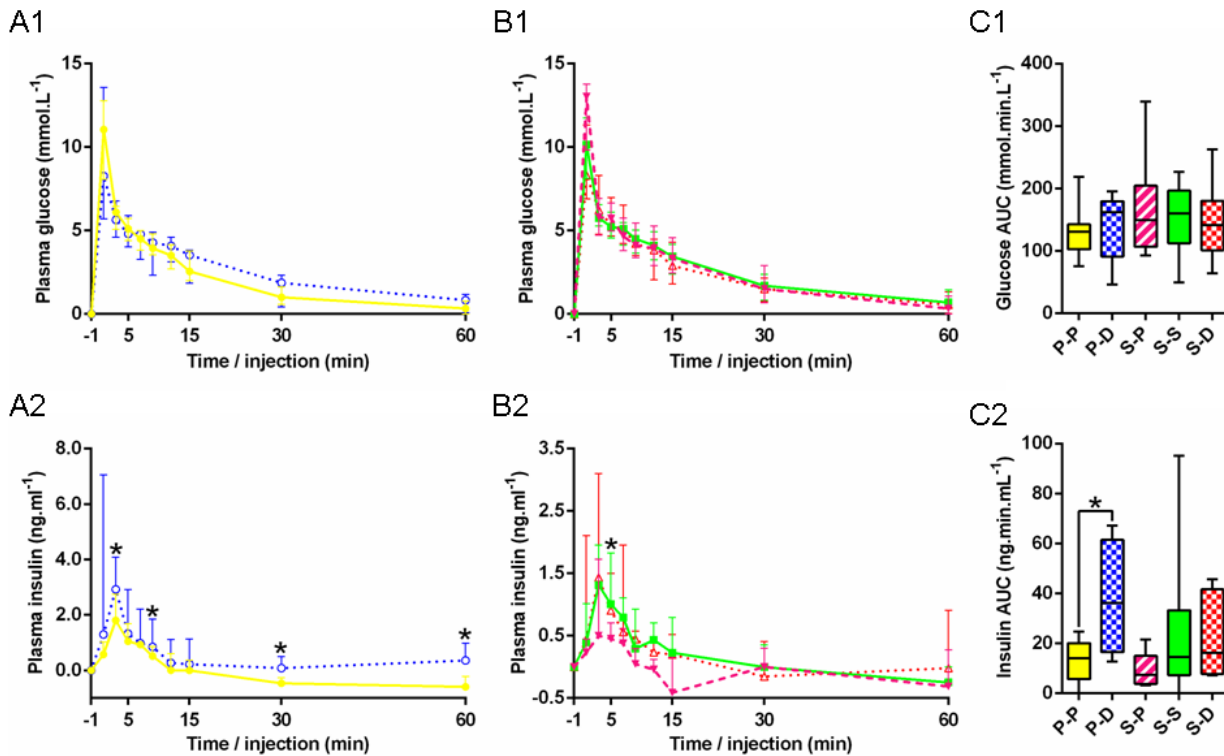
In the present study, we have confirmed that ponies can not be considered miniature versions of saddlebreds. Ponies were systematically fatter than saddlebreds, as confirmed by higher BCS and plasma leptin concentrations in pony mares, inducing confounding factors during pregnancy between obese pony and normal weight saddlebred and draft mares. In foals, significantly higher plasma IGF-1 and  $T_3$  concentrations were observed in ponies vs saddlebreds in the first six months of age. Ponies also appeared to have higher fasting glycemia at most times and reduced glucose metabolism at 6 months compared to saddlebreds. Little sexual dimorphism was observed in both breeds on the parameters studied here.

Reduced fetal growth induced by transfer of saddlebred embryos into pony mares resulted in reduced weight until one month of age. IGF-1 concentrations remained unchanged by embryo transfer.  $T_3$  concentrations were increased shortly after birth compared with saddlebred controls. Moreover, “restricted” S-P foals had higher fasting glucose concentrations. Direct comparison with “enhanced” S-D foals highlighted that S-P foals had increased fasting glucose but a tendency towards reduced insulin secretion with unaffected glucose clearance after IVGTT, indicating increased glucose tolerance and increased insulin sensitivity, respectively, as well as a higher glucose metabolism at 6 months of age, confirming increased insulin sensitivity.

Enhanced fetal growth affected the ponies more than the saddlebreds, possibly due to a larger difference in body size between ponies and draft mares compared to saddlebreds and draft mares. P-D foals remained heavier than their pony controls until weaning and had significantly reduced  $T_3$  and  $T_4$  concentrations. IGF-1 concentrations remained unchanged by embryo transfer. Fasting glucose was decreased at most times and early glucose tolerance tests indicated insulin resistance in “enhanced” neonatal foals compared to control ponies in which insulin resistance developed at 6 months of age.

One limitation of this study is that control groups were produced by artificial insemination, whereas experimental groups were produced by embryo transfer. Although data are lacking in the horse, it has been previously shown in humans and in rodent models that assisted reproductive technologies such as *in vitro* fertilization and/or ovarian hyperstimulation as well as culture media could lead to imprinting disorders and abnormalities in post-natal growth, body composition, glucose metabolism, behavior or systolic blood pressure in adult offspring [34–38]. Combined effects of hyperstimulation and embryo treatment have been demonstrated on *H19* gene imprinting [35,36] but it is still unclear whether embryo transfer as such with limited embryo culture time induces long term effects. In the present study, hyperstimulation was not used. Embryos were maintained in culture media in an Equitainer for a maximum of 6 hours before transfer as usually performed in practice.

Elliott et al (2009) showed that parity was the main factor affecting birthweight, with a limited impact of age in Thoroughbred horses [39]. Here, draft mares were significantly younger than the two other breeds which could result in foals with a reduced birth weight. This did not prevent P-D foals from being significantly heavier than P-P. On the other hand, saddlebred mares had a significantly higher parity compared to both other groups, which may have caused the increased birth weight of S-S foals. The combined effects of young draft mares and higher parity



**Figure 8. Changes in the plasma concentrations of glucose and insulin in response to glucose bolus in the five groups.** **A:** Glycemia (A1) and insulinemia (A2) in P-P (●) vs P-D (○). **B:** Glycemia (B1) and insulinemia (B2) in S-P (▼) vs S-S (■) vs S-D (△). **C:** Area under the curve for glucose (C1) and insulin (C2) in P-P (full yellow), P-D (chequered blue), S-P (striped pink), S-S (full green) and S-D (chequered red) (P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft). Curves are presented as medians and interquartile ranges. The median values under the asterisks differ significantly from each other (F1-LD-F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ). In graph B2, the asterisk indicates a significant difference between S-P and S-S. doi:10.1371/journal.pone.0102044.g008

of saddlebred mares may have contributed to the lack of effect in S-D foals. Due to the low number of animals in some groups, it was not possible to test this hypothesis with statistical analysis. However, correction of the data with regards to parity according to Elliott et al (2009) (+0.7 kg per each unit increase in parity) did not alter the results on foal weight at birth [39].

The metabolism of pony mares was different from that of the other mares used in this study: pony mares could be considered as obese in the beginning of the project, with maximal BCS of 4.5 to 5. Indeed, ponies have in general higher BCS, are more resistant to insulin than standardbred horses [29,40,41], possess higher plasma insulin and leptin concentrations [22] and express components of the equine metabolic syndrome [42]. These metabolic characteristics are the source of confounding factors in this study where the smaller breed was also metabolically different. Unfortunately, fasting blood samples were not collected from the mares before pregnancy so it is not possible to confirm hyperinsulinemia in non-pregnant pony mares, although excess BCS is associated with decreased insulin sensitivity in horses [43,44]. Plasma leptin concentrations were similar to that reported by others in pregnant mares [30,45–47]. Although seasonal variations have been observed in horses [48], all mares were collected at the same time in the season over the two years and also at the same time in the day (morning), thus reducing the variability due to the environment. Leptin concentrations started to decrease earlier in gestation in S-P mares, indicating that the burden of carrying a large fetus may have induced earlier lipomobilization in pony mares, although NEFA only increased at 9 months of

pregnancy and BCS remained stable until just prior to foaling. As shown by others, maternal plasma leptin decreased sharply after birth in all groups, together with increased NEFA and a progressive reduction in BCS associated with lactation [49]. The rapid *postpartum* decrease in circulating leptin may be due to a loss of placental leptin because placental leptin mRNA expression has been reported in humans [50,51], rats [52] and sheep [53]. Unpublished data from our laboratory however indicates that the equine placenta does not express leptin. A *postpartum* reduction in circulating leptin concentrations has been reported in humans [50,51] and Japanese monkeys [54], but not in rats [52] or sheep [55].

In the present study, birth weights were significantly increased by 57% in enhanced P-D foals and decreased by 37% in restricted S-P foals. This is consistent with enhanced Pony-in-Thoroughbred and restricted Thoroughbred-in-Pony foals where a 15% increase and reduction in body dimensions, respectively, were reported [56]. Growth profiles from both enhanced and restricted foals differed from their respective breed controls, with P-D remaining heavier than P-P and S-P remaining lighter than S-D foals, in contrast to what was reported in the pony and thoroughbred embryo transfer experiments where differences had disappeared by 6 months of age [56]. The effects on weight gain were probably higher in the present study because of the bigger size difference between the breeds. Although catch-up growth is often observed in IUGR animals [57–60], this was not observed in this study, probably due to the limited milk production in pony mares. Similarly, increased milk production in draft mares could account

for the growth advantage in P-D foals, since milk yields are known to be breed specific [61] and to be increased with the mare's size [61]. Hormones and growth factors such as  $T_3$  [62], leptin [63], IGF-1 and insulin [64] and thyroid stimulating hormone (TSH) [49] are also supplied through the mare's colostrum. In Quarter horses, milk leptin, IGF-1 and TSH concentrations were at their maximum the day of parturition and reached minimum at 2 months *postpartum* (leptin and TSH) or became undetectable by 12 days *postpartum* (IGF-1) [49]. Those elements moderate the importance of the genetic growth potential, highlighting the importance of the effects of the pre- and post-natal environments on growth until weaning.

Glucose homeostasis depends on both the secretion of insulin by the pancreatic  $\beta$  cells and the sensitivity of skeletal muscles and adipose tissue to insulin. Although a slight sexual dimorphism was observed in saddlebred foals for fasting glucose (with fillies having a slightly more elevated fasting glycemia compared to colts), no other difference related to sex was observed, maybe due to the reduced number of animals in this study. Here, restricted foals were growth retarded compared to their own breed counterparts and appeared slightly dysmature although their gestation length was increased. Dismaturity, which shares many clinical characteristics with prematurity [33], is associated with a reduced insulin secretion in the immediate post-natal period compared to full term foals [65]. Indeed, insulin secretion tended to be reduced in S-P foals at 3 days of age but fasting glucose was increased at most times, suggesting insulin dysregulation. As also described in one month old sheep [66,67], glucose metabolism was increased in S-P foals at 6 months of age, indicating increased insulin sensitivity, which is in agreement with data in several species showing that IUGR in the absence of post-natal catch-up growth improves insulin sensitivity [57,68,69]. In horses, pancreatic maturation is complete around 3 months of age [70], so changes observed at 6 months should not be associated with pancreatic immaturity. In contrast, as also shown previously in ponies transferred into thoroughbred recipient mares [27], P-D had increased  $\beta$  cells response to a glucose bolus compared to P-P foals. Subsequently, P-D had lower fasting plasma glucose concentrations than P-P until 6 months of age although insulin sensitivity remained normal as demonstrated by clamps. S-D foals followed a similar trend for glucose metabolism as observed with P-D foals. Differences were not as marked when compared with their normal size S-S controls but were mostly significant when they were compared with the IUGR S-P. This suggests that these effects were not related to the breed but mainly to the experimental manipulation of growth.

IGF-1 and thyroid hormones are some of the major hormonal factors involved in post-natal growth. IGF-1 is one of the most important regulators of growth in the newborn, mediating most effects of growth hormone (GH). Plasma IGF-1 concentrations, although strongly related to the foal's breed and higher in pony compared to saddlebred foals, were consistent with previously published data [30,49,71] and followed similar trends, with increased concentrations between birth and 3 months of age, as described elsewhere [64,71,72]. In humans, IUGR babies have low plasma concentrations of IGF-1 [73]. In horses, bottled fed foals have lower plasma IGF-1 concentrations compared to those nursing on the mare [71,72], but Panzani *et al.* found no statistical differences in plasma IGF-1 concentrations between sick, induced or naturally delivered foals [72]. Neither reduction nor enhancement of *prepartum* growth affected IGF-1 in the present study.

Thyroid hormones play a crucial role in energy metabolism, thermoregulation, metabolism of nutrients and inorganic ions and for stimulation of growth. They optimize the action of catecholamines and stimulate the synthesis and action of IGF-1

and GH [74]. Plasma  $T_3$  concentrations were breed-related, being higher in pony *vs* saddlebred foals, whereas plasma  $T_4$  concentrations remained unchanged between breeds. This is consistent with previous work demonstrating that plasma  $T_3$  and  $T_4$  concentrations differ between breeds of horses, with no correlation with adult body size and no obvious correlation with physiological status [75]. Thyroid hormones concentrations at birth in foals are higher than at any physiological age in any species and it has been hypothesized that this could be due to the high thermogenic capacity and the rapid growth in this species [76]. Here, growth-enhanced P-D foals had decreased  $T_4$  concentrations in the immediate *postpartum* period and decreased  $T_3$  concentrations from birth to weaning compared to P-P controls. Interestingly, increased weight gain is observed in hypothyroid patients [77], as was observed in these foals. In contrast, S-P foals had elevated  $T_4$  and  $T_3$  concentrations in the first days following parturition compared to saddlebred controls. Since increases in circulating  $T_3$  in the immediate post-natal period were shown to be closely related to adrenocortical activity [78], an increased stress *in utero* in S-P foals due to IUGR may have contributed to the increased neonatal  $T_3$  concentrations in this group. In older individuals, hyperthyroidism is accompanied by an increased metabolic rate, increased thermogenesis and weight loss despite increased food intake [77,79,80]. The increased metabolic rate observed through the clamps in the S-P foals is in agreement with the increased thyroid hormones. Moreover, since about 80% of  $T_3$  is produced by the hepatic deiodination of  $T_4$  [81], the increased  $T_3/T_4$  ratio observed in S-P foals probably reflects increased hepatic deiodinase activity and the contrary is observed in P-D foals.

In conclusion, this work demonstrates that the modification of fetal growth through the transfer of large/small breed embryos into recipients of a small/large breed modifies post-natal growth and thyroid hormones profiles with no catch-up growth at least until weaning. Moreover, glucose metabolism is affected, which may affect further capacity to perform in equestrian sports. Although long term effects have not been studied here, data obtained in other species and in humans strongly indicate that fetal IUGR and fetal overgrowth both induce increased susceptibility to metabolic diseases in adulthood [82]. This may be of importance in the presence of an increasing prevalence of the equine metabolic syndrome [42,83].

## Supporting Information

**Table S1 Nutritional value of the diets on farms 1 and 2.**  
(DOC)

**Table S2 Mares' parameters measured in the five groups.**  
(DOC)

**Table S3 Foals' parameters measured in the five groups.**  
(DOC)

## Acknowledgments

The authors are grateful to Joseph Bellonie, Philippe Barrière, Thierry Gascogne, Thierry Blard, Yvan Gaudé and François Stieau for care and management of the mares and foals and for assistance during metabolic tests and Françoise Ternois and Lionel Lardic for management and assistance in the NEFA and insulin assays.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PCP PP. Performed the experiments: PP LW DS FR CD GD. Analyzed the data: PP PCP.

Contributed reagents/materials/analysis tools: DG AT S. Camous VB MD DS CS. Wrote the paper: PP PCP. Taught techniques for clamps in equine: CS DS. Counseled on experiments: CS DS AT S. Chaffaux.

Helped with bibliography: S. Chaffaux. Counseled on statistical analyses: IJ.

## References

- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ (1989) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *The Lancet* 2: 577–580.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, et al. (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341: 938–941.
- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, et al. (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62–67.
- Ravelli ACJ, van der Meulen JHP, Michels RPJ, Osmond C, Barker DJP, et al. (1998) Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *The Lancet* 351: 173–177.
- Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 70: 811–816.
- Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, et al. (2001) Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 185: 93–98.
- Stettler N, Zemel BS, Kumanyika S, Stallings VA (2002) Infant Weight Gain and Childhood Overweight Status in a Multicenter, Cohort Study. *Pediatrics* 109: 194–199.
- McMullen S, Mostyn A (2009) Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. *Proc Nutr Soc* 68: 306–320.
- Poore KR, Fowden AL (2002) The effect of birth weight on glucose tolerance in pigs at 3 and 12 months of age. *Diabetologia* 45.
- Gatford KL, Mohammad SNB, Harland ML, De Blasio MJ, Fowden AL, et al. (2008) Impaired beta-cell function and inadequate compensatory increases in beta-cell mass after intrauterine growth restriction in sheep. *Endocrinology* 149: 5118–5127.
- Forhead AJ, Broughton Pipkin F, Fowden AL (2000) Effect of cortisol on blood pressure and the renin-angiotensin system in fetal sheep during late gestation. *J Physiol* 526 Pt 1: 167–176.
- Poore KR, Fowden A (2003) The effect of birth weight on hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in juvenile and adult pigs. *J Physiol* 547: 107–116.
- Levin BE (2006) Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Phil Trans R Soc B* 361: 1107–1121.
- Clifton VL (2010) Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival. *Placenta* 31: S33–S39.
- Fowden A, Giusani DA, Forhead AJ (2006) Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology* 21: 29–37.
- Symonds ME, Sebert SP, Budge H (2010) Nutritional regulation of fetal growth and implications for productive life in ruminants. *Animal* 4: 1075–1083.
- Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE (2006) Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *Journal of Animal Science* 84: 2316–2337.
- Rosdale PD, Ousey JC (2002) Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR. *Equine Veterinary Education* 14: 98–111.
- Ansari T, Beech D, Sibbons PD, Rosdale PD, Ousey JC, et al. Pilot investigations into microanatomical defects associated with IUGR in the horse and other domestic animals.; 1998; Sydney, Australia. The Dorothy Haver-meyer Foundation, pp. 15.
- Van der Heyden L, Lejeune JP, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, et al. (2013) Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *Vet Rec* 172: 68.
- Geor R, Frank N (2009) Metabolic syndrome-From human organ disease to laminar failure in equids. *Vet Immunol Immunopathol* 129: 151–154.
- Johnson PJ (2002) The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. *Vet Clin North Am Equine Pract* 18: 271–293.
- Vick MM, Sessions DR, Murphy BA, Kennedy EL, Reedy SE, et al. (2006) Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. *Reprod Fert Dev* 18: 609–617.
- Walton A, Hammond J (1938) The maternal effects on growth and conformation in shire horse-shetland pony crosses. *Proc R Soc Lond B* 125: 311–335.
- Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, et al. (2002) Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* 123: 445–453.
- Giusani DA, Forhead AJ, Gardner DS, Fletcher AJW, Allen WR (2003) Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *J Physiol* 547: 67–76.
- Forhead AJ, Ousey JC, Allen WR, Fowden AL (2004) Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *Journal of Endocrinology* 181: 459–467.
- Arnaud G (2000) Notation de l'état corporel des chevaux de selle et de sport. Paris, France: Institut de l'élevage, INRA, Institut Français du Cheval et de l'Équitation.
- Rijnen KE, van der Kolk JH (2003) Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies. *Am J Vet Res* 64: 1260–1264.
- Salazar-Ortiz J, Camous S, Briant C, Lardic L, Chesneau D, et al. (2011) Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (*Equus caballus*). *Reproductive Biology and Endocrinology* 9.
- Horhorn T, Hornik K, Van de Will MA, Zeileis A (2006) A lego system for conditional inference. *The American Statistician* 60: 257–263.
- Noguchi K, Gel YR, Brunner E, Konietzschke F (2012) nparLD: An R software package for the non parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *J Stat Software* 50: 1–23.
- Rosdale PD (1976) A clinician's view of prematurity and dysmaturity in Thoroughbred foals. *Proc R Soc Med* 69: 631–632.
- Donjacour A, Liu X, Lin W, Simbulan R, Rinaudo P (2014) In Vitro Fertilization Affects Growth and Glucose Metabolism in a Sex-Specific Manner in an Outbred Mouse Model. *Biol Reprod*.
- Watkins A, Lucas ES, Fleming T (2010) Impact of the periconceptual environment on the programming of adult disease. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 1: 1–9.
- Market-Velker BA, Fernandes AD, Mann MR (2010) Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. *Biol Reprod* 83: 938–950.
- Watkins AJ, Platt D, Papenbrock T, Wilkins A, Eckert JJ, et al. (2007) Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5449–5454.
- Hemkemeyer SA, Schwarzer C, Boiani M, Ehmcke J, Le Gac S, et al. (2014) Effects of embryo culture media do not persist after implantation: a histological study in mice. *Hum Reprod* 29: 220–233.
- Elliott C, Morton J, Chopin J (2009) Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. *Theriogenology* 71: 683–689.
- Bamford NJ, Potter SJ, Harris PA, Bailey SR (2013) Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. *Domest Anim Endocrinol*: in press.
- Jeffcott LB, Field JR, McLean JG, O'Dea K (1986) Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. *Equine Vet J* 18: 97–101.
- Frank N, Geor RJ, Bailey SR, Durham AE, Johnson PJ, et al. (2010) Equine metabolic syndrome. *J Vet Intern Med* 24: 467–475.
- Hoffman RM, Boston RC, Stefanovski D, Kronfeld DS, Harris PA (2003) Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. *J Anim Sci* 81: 2333–2342.
- Powell DM, Reedy SE, Sessions DR, Fitzgerald BP (2002) Effect of short-term exercise training on insulin sensitivity in obese and lean mares. *Equine Vet J Suppl*: 81–84.
- Romagnoli U, Macchi E, Romano G, Motta M, Accornero P, et al. (2007) Leptin concentration in plasma and in milk during the interpartum period in the mare. *Animal Reproduction Science* 97: 180–185.
- Heidler B, Aurich JE, Pohl W, Aurich C (2004) Body weight of mares and foals, estrous cycles and plasma glucose concentration in lactating and non-lactating Lipizzaner mares. *Theriogenology* 61: 883–893.
- Buff PR, Dodds AC, Morrison CD, Whitley NC, McFadin EL, et al. (2002) Leptin in horses: Tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *J Anim Sci* 80: 2942–2948.
- Radin MJ, Sharkey LC, Holycross BJ (2009) Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. *Vet Clin Pathol* 38: 136–156.
- Berg EL, McNamara DL, Keisler DH (2007) Endocrine profiles of periparturient mares and their foals. *J Anim Sci* 85: 1660–1668.
- Ben X, Qin Y, Wu S, Zhang W, Cai W (2001) Placental leptin correlates with intrauterine fetal growth and development. *Chin Med J (Engl)* 114: 636–639.
- Jakimiuk AJ, Skalba P, Hutterski D, Tarkowski R, Haczynski J, et al. (2003) Leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the human placenta at term: relationship to levels of leptin in cord blood and placental weight. *Gynecol Endocrinol* 17: 311–316.
- Kawai M, Yamaguchi M, Murakami T, Shima K, Murata Y, et al. (1997) The placenta is not the main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 798–802.
- Thomas L, Wallace JM, Aitken RP, Mercer JG, Trayhurn P, et al. (2001) Circulating leptin during ovine pregnancy in relation to maternal nutrition, body composition and pregnancy outcome. *J Endocrinol* 169.
- Wang C, Medan MS, Shimizu K, Kojima C, Itoh M, et al. (2005) Secretion of leptin throughout pregnancy and early postpartum period in Japanese monkeys: placenta as another potential source of leptin. *Endocrine* 27: 75–81.
- Thomas CR, Oon BB, Lowy C (2001) Placental transfer of lactate, glucose and 2-deoxyglucose in control and diabetic Wistar rats. *Int J Exp Diabetes Res* 2: 113–120.

56. Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM (2004) The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction* 127: 67–77.
57. Berends LM, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Cripps RL, Ozanne SE (2013) Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 37: 1051–1057.
58. Pardo CE, Kreuzer M, Bee G (2013) Effect of average litter weight in pigs on growth performance, carcass characteristics and meat quality of the offspring as depending on birth weight. *Animal* 7: 1884–1892.
59. Gonzalez-Bulnes A, Ovilo C, Lopez-Bote CJ, Astiz S, Ayuso M, et al. (2012) Gender-specific early postnatal catch-up growth after intrauterine growth retardation by food restriction in swine with obesity/leptin resistance. *Reproduction* 144: 269–278.
60. De Blasio MJ, Gatford KL, Robinson JS, Owens JA (2007) Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R875–886.
61. Doreau M, Boulot S (1989) Recent knowledge on mare milk production: a review. *Livestock Production Science* 22: 213–235.
62. Slebodzinski AB, Brzezinska-Slebobdzinska E, Nowak J, Kowalska K (1998) Triiodothyronine (T<sub>3</sub>), insulin and characteristics of 5'-monodeiodinase (5'-MD) in mare's milk from parturition to 21 days post-partum. *Reprod Nutr Dev* 38: 235–244.
63. Salimei E, Varisco G, Rosi F (2002) Major constituents, leptin, and non-protein nitrogen compounds in mares' colostrum and milk. *Reprod Nutr Dev* 42: 65–72.
64. Hess-Dudan F, Vacher PY, Bruckmaier RM, Weishaupt MA, Burger D, et al. (1994) Immunoreactive insulin-like growth factor I and insulin in blood plasma and milk of mares and in blood plasma of foals. *Equine vet J* 26: 134–139.
65. Fowden AL, Silver M, Ellis L, Ousey J, Rossdale PD (1984) Studies on equine prematurity 3: Insulin secretion in the foal during the perinatal period. *Equine Vet J* 16: 286–291.
66. De Blasio MJ, Gatford KL, Harland ML, Robinson JS, Owens JA (2012) Placental Restriction Reduces Insulin Sensitivity and Expression of Insulin Signaling and Glucose Transporter Genes in Skeletal Muscle, But Not Liver, in Young Sheep. *Endocrinology* 153: 2142–2151.
67. De Blasio MJ, Gatford KL, McMillen IC, Robinson JS, Owens JA (2007) Placental restriction of fetal growth increases insulin action, growth, and adiposity in the young lamb. *Endocrinology* 148: 1350–1358.
68. Lim K, Armitage JA, Stefanidis A, Oldfield BJ, Black MJ (2011) IUGR in the absence of postnatal "catch-up" growth leads to improved whole body insulin sensitivity in rat offspring. *Pediatr Res* 70: 339–344.
69. Owens JA, Thavaneswaran P, De Blasio MJ, McMillen IC, Robinson JS, et al. (2007) Sex-specific effects of placental restriction on components of the metabolic syndrome in young adult sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1879–1889.
70. Firshman AM, Valberg SJ (2007) Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in horses. *Equine Vet J* 39: 567–575.
71. Cymbaluk NF, Laarveld B (1996) The ontogeny of serum insulin-like growth factor-I concentration in foals: Effects of dam parity, diet, and age at weaning. *Domestic Animal Endocrinology* 13: 197–209.
72. Panzani S, Comin A, Galeati G, Romano G, Villani M, et al. (2012) How type of parturition and health status influence hormonal and metabolic profiles in newborn foals. *Theriogenology* 77: 1167–1177.
73. Ohkawa N, Shoji H, Kitamura T, Suganuma H, Yoshikawa N, et al. (2010) IGF-I, leptin and active ghrelin levels in very low birth weight infants during the first 8 weeks of life. *Acta Paediatr* 99: 37–41.
74. Ogilvy-Stuart AL (2002) Neonatal thyroid disorders. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 87: F165–171.
75. Malinowski K, Christensen RA, Hafs HD, Scanes CG (1996) Age and breed differences in thyroid hormones, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins in female horses. *J Anim Sci* 74: 1936–1942.
76. Irvine CH, Evans MJ (1975) Postnatal changes in total and free thyroxine and triiodothyronine in foal serum. *J Reprod Fert Suppl*: 709–715.
77. Kim B (2008) Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid* 18: 141–144.
78. Silver M, Fowden AL, Knox J, Ousey JC, Cash R, et al. (1991) Relationship between circulating tri-iodothyronine and cortisol in the perinatal period in the foal. *J Reprod Fert Suppl* 44: 619–626.
79. Sainsbury A, Zhang L (2012) Role of the hypothalamus in the neuroendocrine regulation of body weight and composition during energy deficit. *Obes Rev* 13: 234–257.
80. Klein I, Ojamaa K (2001) Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 344: 501–509.
81. Larsen PR, Davies TF, Hay ID (1998) The Thyroid Gland. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders. pp. 389–515.
82. Hanson M, Gluckman P (2011) Developmental origins of noncommunicable disease: population and public health implications. *American Journal of Clinical Nutrition* 94: 1754S–1758S.
83. Frank N, Tadros EM (2014) Insulin dysregulation. *Equine Vet J* 46: 103–112.

**Table S1. Nutritional value of the diets on farms 1 and 2.**

FARM 1 IN NOUZILLY					
<b>PREGNANT AND LACTATING PONY MARES</b>					
	<b>DM (kg)</b>	<b>UFC</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UFC</b>	<b>MADC/UFC</b>
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational months 5 to 8	5,23	2,3	158,51	2,28	69,16
Gestational month 9	5,30	2,9	208,00	1,83	71,72
Gestational month 10	4,50	2,8	169,22	1,58	59,48
Gestational month 11	4,50	2,8	169,00	1,61	60,36
First 10 days after foaling (P-P mares in 2011 and 2012 and S-P mares in 2012)	10,11	6,4	459,03	1,59	72,01
First 2 months after foaling (S-P mares in 2011)	9,00	5,4	489,00	1,66	90,01
Until weaning at age 6 months	Pasture				
<b>POST-WEANING P-P and S-P FOALS</b>					
	<b>DM (kg)</b>	<b>UFC</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UFC</b>	<b>MADC/UFC</b>
Age 7 to 12 months (P-P foals born in 2011 and 2012)	3,90	2,8	228,00	1,41	81,99
Age 6 months (S-P foals born in 2011)	4,90	2,5	129,61	1,99	52,76
Age 7 months (S-P foals born in 2011)	4,90	3,3	358,00	1,50	109,25
Age 7 to 8 months (S-P foals born in 2012)	5,30	4,4	446,91	1,21	101,77

**FARM 2 IN CHAMBERET**

<b>PREGNANT AND LACTATING SADDLEBRED MARES</b>	<b>DM (kg)</b>	<b>UFC</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UFC</b>	<b>MADC/UFC</b>
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational month 5	8,29	5,9	344,5	1,42	58,89
Gestational month 6	9,70	7,3	448,0	1,33	61,37
Gestational month 7	9,80	8,3	497,0	1,18	59,88
Gestational month 8	9,10	7,3	463,6	1,24	63,23
Gestational months 9 and 10	9,50	7,1	601,0	1,34	84,65
Gestational month 11	9,1	6,7	540	1,36	80,60
First 3 days after foaling	15,4	12,5	1364,5	1,23	109,16
Until weaning at age 6 months	Pasture				

<b>PREGNANT AND LACTATING DRAFT MARES</b>	<b>DM (kg)</b>	<b>UFC</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UFC</b>	<b>MADC/UFC</b>
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational month 5	7,60	5,8	440,00	1,31	75,86
Gestational month 6	9,00	7,1	446,50	1,28	63,33
Gestational month 7	9,80	8,3	497,00	1,18	59,88
Gestational month 8	9,60	7,3	456,00	1,32	62,47
Gestational months 9 and 10	8,60	8,4	732,00	1,02	87,14
Gestational month 11	10,6	8,5	622	1,25	73,14
First 3 days after foaling	14,7	10,9	976	1,35	89,54
Until weaning at age 6 months	Pasture				

<b>POST-WEANING P-D FOALS</b>	<b>DM (kg)</b>	<b>UFC</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UFC</b>	<b>MADC/UFC</b>
Age 7 to 12 months (P-D born in 2011)	3,05	1,5	143,00	2,09	97,95
Age 7 and 8 months (P-D born in 2012)	?	1,9	208,73	?	?

<b>POST-WEANING S-S AND S-D FOALS</b>	<b>DM (kg)</b>	<b>UFC</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UFC</b>	<b>MADC/UFC</b>
Age 6 to 12 months (S-S and S-D born in 2011)	3,05	1,5	143,00	2,09	97,95
Age 6 to 12 months (S-S born in 2012)	4,93	1,9	208,73	2,57	108,71

DM: dry matter, UFC: horse feed unit, MADC: horse digestible crude protein. P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft.



**Table S2. Mares' parameters measured in the five groups.**

	P-P	P-D	S-P	S-S	S-D
Gestation length (days)	334.0 [328.0-340.1]	327.7 [321.5-332.7]	344.0 [334.5-353.8]	330.8 [325.9-336.3]	328.0 [327.0-334.1]
5 <sup>th</sup> gestational month	359.0 [298.5-402.0]	816.0 [762.0-877.0]	400.0 [373.5-420.8]	622.6 [559.6-652.4]	792.0 [749.3-854.8]
11 <sup>th</sup> gestational month	356.0 [299.0-395.5]	840.0 [768.1-913.3]	405.0 [380.8-433.5]	646.0 [607.3-685.6]	842.9 [783.0-882.4]
1 day <i>postpartum</i>	328.0 [277.5-366.5]	772.2 [708.6-821.3]	378.0 [322.8-390.3]	578.3 [538.3-597.1]	761.7 [712.4-780.9]
6 months <i>postpartum</i>	325.0 [263.0-354.5]	761.6 [735.2-825.9]	361.5 [333.8-375.8]	550.5 [531.4-597.8]	697.3 [667.1-722.4]
5 <sup>th</sup> gestational month	5.00 [4.75-5.00]	3.88 [3.56-4.06]	5.00 [4.25-5.00]	3.75 [3.25-3.88]	3.88 [3.13-4.00]
11 <sup>th</sup> gestational month	4.50 [4.00-5.00]	3.75 [3.19-4.00]	4.75 [4.13-5.00]	3.63 [3.19-3.75]	3.75 [3.19-4.13]
1 day <i>postpartum</i>	4.00 [3.75-4.75]	3.63 [3.00-3.81]	4.00 [3.75-4.50]	3.25 [3.00-3.75]	3.75 [3.50-4.50]
6 months <i>postpartum</i>	3.00 [2.50-4.25]	3.38 [3.00-4.06]	2.50 [2.00-2.50]	2.50 [2.38-3.38]	3.00 [2.25-3.56]
5 <sup>th</sup> gestational month	127.0 [90.0-182.5]	110.0 [66.0-155.0]	248.5 [119.5-402.3]	136.0 [109.8-307.0]	165.5 [135.3-194.3]
11 <sup>th</sup> gestational month	359.0 [175.0-819.5]	124.5 [106.5-177.3]	344.0 [190.8-563.5]	112.0 [102.0-181.5]	151.5 [108.5-199.5]
1 day <i>postpartum</i>	272.0 [155.0-548.3]	611.0 [341.0-724.0]	525.5 [224.0-827.0]	340.5 [239.0-489.3]	451.5 [218.8-876.5]
5 or 6 months <i>postpartum</i>	523.0 [446.0-637.3]	497.0 [408.5-576.5]	354.5 [325.0-384.0]	254.0 [141.5-453.3]	670.0 [33.00-708.0]
5 <sup>th</sup> gestational month	6.65 [5.75-8.35]	3.57 [2.40-4.64]	5.97 [3.02-8.48]	3.73 [3.05-7.73]	4.46 [3.85-4.63]
11 <sup>th</sup> gestational month	6.71 [5.32-8.30]	3.20 [2.24-3.85]	1.56 [0.86-3.55]	3.24 [2.23-4.59]	4.09 [3.89-4.57]
1 day <i>postpartum</i>	4.81 [3.06-5.68]	1.40 [1.13-1.57]	1.84 [1.16-4.74]	1.51 [1.15-2.09]	1.16 [0.70-1.38]
5 or 6 months <i>postpartum</i>	1.03 [0.79-1.75]	1.07 [0.81-1.34]	1.20 [0.46-3.34]	1.22 [0.65-1.57]	0.99 [0.69-1.16]

Values are presented as median [quartile 1-quartile 3]. P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft.

**Table S3. Foals' parameters measured in the five groups.**

	P-P	P-D	S-P	S-S	S-D	
Body weight (kg)	day 0	25.5 [22.5-32.0]	40.1 [33.6-40.9]	31.0 [28.0-41.5]	49.4 [43.9-55.4]	53.8 [50.3-59.8]
	day 180	135.0 [106.5-147.5]	184.9 [170.8-201.0]	152.5 [137.5-184.8]	213.6 [195.3-234.4]	223.9 [215.8-248.0]
Weight gain (kg.d <sup>-1</sup> )	day 0 to 180	0.60 [0.46-0.67]	0.82 [0.75-0.90]	0.69 [0.60-0.80]	0.92 [0.83-1.00]	0.95 [0.91-1.05]
	day 0	233.7 [221.8-301.5]	248.4 [236.5-289.4]	198.3 [152.4-383.4]	168.7 [145.7-200.1]	174.7 [155.4-197.1]
	day 3	388.6 [313.1-448.8]	489.9 [393.6-572.3]	191.6 [141.4-224.6]	210.6 [165.5-255.0]	216.0 [135.0-254.9]
	day 90	777.2 [633.3-824.6]	727.6 [674.1-824.2]	287.8 [269.6-325.1]	290.0 [236.2-378.9]	421.7 [322.2-507.6]
	day 180	554.7 [398.8-685.4]	608.1 [550.9-744.4]	321.2 [179.4-447.4]	266.8 [199.1-309.9]	202.5 [154.2-369.0]
	day 0	4.08 [3.71-5.04]	3.96 [2.40-5.25]	6.46 [5.60-8.10]	5.87 [4.37-8.18]	6.55 [4.58-10.49]
Plasma T <sub>3</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	day 3	5.72 [4.15-6.30]	2.55 [1.98-4.85]	5.26 [4.40-6.10]	2.75 [1.48-4.12]	3.78 [1.92-6.04]
	day 90	0.87 [0.75-1.33]	0.59 [0.47-0.69]	0.76 [0.56-1.11]	0.54 [0.47-0.72]	0.66 [0.60-0.74]
	day 180	0.61 [0.51-0.75]	0.32 [0.24-0.58]	0.69 [0.51-1.01]	0.41 [0.34-0.49]	0.16 [0.14-0.23]
	day 0	392.3 [300.9-462.3]	296.3 [209.0-317.8]	484.5 [422.1-517.4]	371.5 [303.7-414.0]	268.4 [249.3-333.2]
Plasma T <sub>4</sub> (ng.mL <sup>-1</sup> )	day 3	219.2 [161.5-279.8]	74.85 [57.62-89.93]	238.0 [193.4-327.3]	116.3 [85.8-203.8]	99.22 [52.93-174.5]
	day 90	26.81 [19.44-30.81]	37.02 [21.25-46.85]	36.60 [29.63-50.54]	34.79 [24.94-45.93]	34.81 [21.44-44.33]
	day 180	27.31 [16.59-38.86]	27.60 [22.18-32.52]	23.68 [16.77-28.20]	27.51 [19.33-32.77]	22.77 [13.72-31.62]
	day 0	0.011 [0.010-0.015]	0.013 [0.008-0.022]	0.014 [0.011-0.016]	0.015 [0.011-0.026]	0.027 [0.017-0.040]
Plasma T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>	day 3	0.025 [0.020-0.030]	0.040 [0.028-0.067]	0.023 [0.017-0.029]	0.019 [0.014-0.029]	0.045 [0.016-0.099]
	day 90	0.035 [0.024-0.052]	0.016 [0.011-0.029]	0.019 [0.016-0.023]	0.016 [0.011-0.025]	0.017 [0.014-0.026]
	day 180	0.022 [0.015-0.049]	0.014 [0.009-0.020]	0.038 [0.021-0.042]	0.014 [0.012-0.020]	0.007 [0.005-0.011]
	day3	6.56 [5.64-7.25]	6.14 [4.26-7.18]	7.36 [5.99-8.36]	6.28 [5.24-6.56]	5.72 [4.28-7.15]
Fasting glucose (mmol.L <sup>-1</sup> )	day 30	8.72 [8.06-9.33]	5.53 [4.90-6.06]	8.58 [6.83-9.75]	5.33 [4.72-5.89]	5.95 [5.00-6.14]
	day 90	6.72 [6.44-7.28]	5.39 [5.04-6.06]	7.03 [6.89-7.46]	4.28 [3.86-5.13]	5.12 [4.25-5.56]
	day 140	5.67 [5.11-5.92]	5.25 [4.51-5.74]	5.17 [4.86-5.76]	5.28 [4.67-5.86]	4.20 [3.97-5.77]
	day 180	5.72 [5.28-6.59]	4.75 [4.06-5.36]	6.81 [5.64-10.50]	4.67 [3.86-5.31]	3.81 [2.71-4.56]
	day 200	5.67 [5.22-6.06]	6.14 [4.92-6.54]	5.92 [4.53-6.65]	4.94 [4.50-5.75]	4.47 [4.33-4.71]
	day 3	0.94 [0.41-1.25]	0.91 [0.51-1.32]	0.43 [0.20-0.88]	0.76 [0.10-1.34]	0.91 [0.48-1.19]
Glucose AUC (mmol.min.L <sup>-1</sup> )	day 3	131.0 [102.8-142.8]	162.1 [91.02-179.6]	149.7 [106.7-204.7]	160.0 [112.3-196.6]	141.4 [101.1-180.5]
	day 3	14.03 [5.67-20.09]	36.22 [16.52-61.46]	7.47 [3.79-15.01]	14.53 [7.28-33.27]	16.19 [7.80-41.64]
Glucose metabolism rate (mmol/kg.min <sup>-1</sup> )	day 200	0.01260	0.01163	0.02468	0.01953	0.01622
	day 200	[0.01081-0.01776]	[0.01054-0.01891]	[0.02044-0.03543]	[0.01409-0.02997]	[0.01297-0.01968]

Values are presented as median [quartile 1-quartile 3]. P-P: Pony in Pony, P-D: Pony in Draft, S-P: Saddlebred in Pony, S-S: Saddlebred in Saddlebred, S-D: Saddlebred in Draft.



### **2.3. Article: “Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in weaned horses”**

**Peugnet P**, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, Guillaume D, Dahirel M, Dubois C, Reigner F, Berthelot V, Chaffaux S, Tarrade A, Serteyn D, Chavatte-Palmer P

*Article en préparation pour soumission à PLoS ONE.*



## **Enhanced or Reduced Fetal Growth Induced by Embryo Transfer into Smaller or Larger Breeds Alters Post-Natal Growth and Metabolism in Weaned Horses**

Pauline Peugnet<sup>1,2</sup>, Laurence Wimmel<sup>3</sup>, Guy Duchamp<sup>4</sup>, Charlotte Sandersen<sup>5</sup>, Sylvaine Camous<sup>1,2</sup>, Daniel Guillaume<sup>6,7,8,9</sup>, Michèle Dahirel<sup>1,2</sup>, Cédric Dubois<sup>3</sup>, Fabrice Reigner<sup>4</sup>, Valérie Berthelot<sup>10,11</sup>, Stéphane Chaffaux<sup>1,2</sup>, Anne Tarrade<sup>1,2</sup>, Didier Serteyn<sup>5</sup>, Pascale Chavatte-Palmer<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France; <sup>2</sup>ENVA, F-94700 Maisons Alfort, France; <sup>3</sup>IFCE, Station Expérimentale de la Valade, F-19370 Chamberet, France; <sup>4</sup>INRA, UE1293, F-37380 Nouzilly, France; <sup>5</sup>Clinique équine, Faculté de Médecine Vétérinaire, CORD, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique; <sup>6</sup>INRA, UMR85, Physiologie de la Reproduction et Comportements, F-37380 Nouzilly, France; <sup>7</sup>CNRS, UMR7247, F-37380 Nouzilly, France; <sup>8</sup>Université François Rabelais de Tours, F-37000 Tours, France; <sup>9</sup>IFCE, F-37380 Nouzilly, France; <sup>10</sup>INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, F-75005 Paris, France; <sup>11</sup>AgroParis Tech, F-75005 Paris, France

**\*Corresponding author:** pascale.chavatte@jouy.inra.fr

## ABSTRACT

We have previously demonstrated that embryo transfer between breeds of different sizes in equids can increase or restrict fetal growth, which elicits different adaptive responses in post-natal growth and glucose metabolism until weaning at 180 days of age. Post-weaning effects, however, remain to be described. In this study, fetal growth was enhanced or restricted through ET using pony (P), saddlebred (S) and draft (D) horses. Control P-P (n = 21) and S-S (n = 28) pregnancies were obtained by AI. Enhanced and restricted pregnancies were obtained by transferring P or S embryos into D mares (P-D, n = 6 and S-D, n = 8) and S embryos into P mares (S-P, n = 6), respectively. Control and experimental foals were raised by their dams and recipient mothers, respectively. Weight gain, growth hormones and glucose homeostasis were investigated in the foals from weaning on day 180 to day 540. P-D foals remained heavier on days 180 (+37%), 360 (+33%) and 540 (+29%), with increased T3 concentrations on day 180 compared to P-P foals. P-D foals had lower fasting glucose, but increased NEFA concentrations on days 180, 360 and 540, with similar glucose clearance after IVGTT on day 360 and similar insulin sensitivity during euglycemic clamps on day 540 compared to P-D foals. S-P foals were lighter (-32%), with higher T3 and lower NEFA concentrations, on day 180 compared to S-D foals. S-P foals caught up with them thereafter. They had higher fasting glucose on days 180, 360 and 540. Both S-P and S-D groups had slower glucose clearance than S-S foals after IVGTT on day 360, but all three saddlebred groups had similar insulin sensitivity during clamps on day 540. None of our antenatal manipulation affected post-weaning IGF-1 and leptin concentrations. Thus, combined effects of the enhanced fetal and pre-weaning environments

persisted until 18 months of age in ponies. Fetal and pre-weaning restriction in saddlebreds induced catch-up growth and progressive change from hyper to normal insulin sensitivity. This confirms different adaptive responses to early developmental events and suggests potential further evolution of glucose metabolism regulation beyond 18 months of age.

## **INTRODUCTION**

Developmental conditions play an important role in determining some of the physiological characteristics of adults, as demonstrated by epidemiological studies in humans [1-6] and experiments in animal models [7,8]. An adverse fetal environment may alter an individual's post-natal blood pressure and glucose tolerance [9], pancreatic islet [10], renin-angiotensin system [11] and hypothalamic-pituitary-adrenal axis [12] function, depending on the timing, duration and nature of the intra-uterine perturbation [13], as well as on the genotype and sex of the individual. Although a reduced birth weight (considered as a marker of suboptimal fetal growth) was first pointed out as an indicator of increased risks of developing metabolic pathologies in adults, it is now established that excess birth weight also leads to adverse programming, with risks following a U-shaped curve in relation to birth weight [14-17]. The critical time of tissue plasticity in response to environmental *stimuli*, however, extends beyond birth and particularly to the suckling period during which lactation is an important programming factor [13,18,19]. Nutritional management during this early post-natal period may either improve or exacerbate structural and functional alterations programmed *in utero*.



Studies of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) are particularly relevant in horses, which are used to perform in challenging sport disciplines. It has previously been shown that intra-uterine growth retarded (IUGR) equids are prone to various pathological conditions from birth to adult age, such as abnormalities in the pulmonary microstructure, respiratory dysfunction, neuropathies, hyperlipidemia and musculoskeletal injuries [20,21]. Using artificial insemination to cross-breed Shetland ponies and large Shire horses [22] or using the transfer of Polish pony embryos into the uterus of draft mares [23,24], Walton and Tischner were the first to demonstrate the importance of the maternal environment to modulate the foal's genetic potential for fetal and post-natal growth, as the breed-specific growth potential of the foal can be regulated by the size of the mare. More recently, Allen and colleagues used embryo transfers between breeds of different sizes (ponies and Thoroughbreds) as a model of restricted (Thoroughbred-in-pony) or increased (pony-in-Thoroughbred) nutritional supply to the fetus [25]. Restricted or increased fetal and post-natal growth [25,26] were associated with neonatal alterations in glucose sensitivity of  $\beta$  pancreatic islets [27], adrenocortical development [28], blood pressure and catecholamine response to hypotension [29]. In terms of nutrition, long term programming effects of maternal nutrition have also been demonstrated as foals born to dams fed a high-starch diet in late gestation tend to be less insulin sensitive five months after birth compared to foals born to dams fed a low-starch diet [30]. Epidemiological studies highlighted the adverse effects of feeding concentrates to pregnant mares, but also to foals for the first year of age, on post-natal development of osteochondrosis lesions [31].

As a consequence, there is a need for further studies to examine the long term impacts of developmental perturbations in horses, as fetal development and post-natal growth represent two potential windows of intervention to optimize athletic capacities. The present study is the continuation of previous work in which fetal growth was enhanced by transferring pony and saddlebred embryos into draft mares or restricted by transferring saddlebred embryos into pony mares. This was shown to induce different adaptive responses in terms of growth, endocrine profiles and glucose metabolism in pre-weaning foals [32]. Overgrown ponies born to draft dams were less sensitive to insulin earlier than normal ponies, with reduced thyroid hormones and fasting glucose levels, whereas *in utero* growth retarded saddlebreds were more sensitive than saddlebreds born to draft dams, with elevated thyroid hormones and fasting glucose levels. Here, we investigated weight gain, glucose homeostasis and endocrine factors involved in both growth and energy regulation in the same foals from weaning to 18 months of age.

## **MATERIALS AND METHODS**

The animal studies were approved by the local animal care and use committee (« Comité des Utilisateurs de la Station Expérimentale de Chamberet ») and received ethical approval from the local ethics committee (« Comité Régional d’Ethique pour l’Expérimentation Animale de Limousin ») under protocol number 5-2013-5.

### **Establishment of experimental and control groups**

Experimental and control groups were established over 2 successive breeding seasons (foaling in 2011 and 2012) using semen from 1 pony and 2 saddlebred

stallions as previously described [32]. Following embryo recovery after ovulation in the pony and saddlebred donor mares and between-breed transfer of the embryos into synchronized pony and draft recipient mares, 6 Pony-in-Draft (P-D), 6 Saddlebred-in-Pony (S-P) and 8 Saddlebred-in-Draft (S-D) experimental foals were produced. Twenty-one Pony-in-Pony and 28 Saddlebred-in-Saddlebred control foals were produced by artificial insemination using the same stallions as for embryo production. Experimental and control foals were raised by their surrogate mother and biological dam, respectively. All the foals were weaned at 180 days of age [32].

### **Nutrition and general care of post-weaning foals**

From weaning at 6 months of age to 12 months of age (xwinter months), foals were housed in open barns consisting in a covered area with straw and free access to an outdoor run. The diet of the foals was calculated to cover nutritional needs of foals as defined by INRA recommendations according to age and adult bodyweight. Foals in farm 1 received oat, soybean cake and hay with free access to minerals and vitamins (Sodical, Salins Agriculture, France), with the exception of S-P foals occasionally receiving extra commercial pellets (Eperon, Tellus Nutrition Animale, France) or corn grain. Foals on farm 2 received a homemade pellet of barley, soybean cake, molasses and minerals and vitamins (Excel Prima S, Chaveau Nutrition, France) with hay, as well as hilage when needed. Feedstuff was distributed in two daily meals (morning and evening) on farm 1, but pellets were distributed by an automated concentrate feeding system. which enables the foals to access their pellets on demand, in several meals. Quality of feedstuff was measured. Males were gelded around 9 months of age.

From 12 months to 18 months of age (spring and summer months), grazing was available 24 h/day for fillies and geldings which were conducted in one same herd on each farm. From 18 to 24 months of age (winter months), they were housed in open barns again, as previously described, except that those on farm 2 had no automated concentrate feeding system. As a consequence, feedstuff was distributed in two daily meals in both farms. Foals on farm 1 received commercial pellets (Eperon, Tellus Nutrition Animale, France) with free access to minerals and vitamins (Sodical, Chauveau Nutrition, France), with the exception that S-P foals received additional oat and hay. Foals on farm 2 were fed the same homemade pellet as described above, with hay and hailage. Nutritional offer was calculated to cover nutritional needs of foals as defined by INRA recommendations according to age and adult bodyweight [33]. Quality of feedstuff was measured.

Foals were vaccinated and dewormed as for standard care throughout the protocol.

### **Weight gain monitoring and blood sampling in post-weaning foals**

Foals were weighed at 180, 270, 360 and 540 days of age. Blood samples were collected on EDTA from the jugular vein between 9 AM and 10 AM after overnight fasting at 180, 360 and 540 days of age. They were centrifuged at 3,500 g for 10 minutes and plasma was separated and stored at -20°C until Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), thyroid hormones (thyroxine T<sub>4</sub> and triiodothyronine T<sub>3</sub>), non-esterified fatty acids (NEFA) and leptin assay. IGF-1, T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> are essential factors of growth and energetic homeostasis. Plasma NEFA concentrations reflect the mobilization of body fat in case of energy deficit, whereas plasma leptin concentrations are used as a proxy for adiposity.

### **Glucose metabolism monitoring in post-weaning foals**

Glycemia was measured at 180, 200, 360 and 540 days of age after overnight fasting using an automated analyzer (Medisense Optium Xceed®, Abbott, Illinois, USA). Intravenous glucose tolerance tests (IVGTT) were performed in foals at 360 days of age after overnight fasting and using a 0.25 g/kg glucose bolus over 2 minutes, as described previously [32]. Hyperinsulinemic euglycemic clamps were performed in foals at 540 days of age as described previously [32]. Briefly, a priming dose of 45 mU of insulin/kg IV was first injected to induce hyperinsulinemia. Immediately thereafter, insulin and glucose were infused at a rate of 6 mU/kg/min and 8.6  $\mu$ mol/kg/min, respectively. The glucose infusion rate was adjusted to reach a steady state of 4.4 to 6.7 mmol/L that was maintained for at least 40 min.

### **Biochemical analyses**

Plasma IGF-1, T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> concentrations were measured in foals in duplicate with commercial RIA kits (CISbio International, Gif-sur-Yvette, France) as previously described [32]. The minimum levels of detection were 1.0 ng/mL, 2.5 ng/mL and 0.1 ng/mL, respectively for plasma IGF-1, T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub>. Intra- and inter-assay coefficients of variation were respectively 3.5% and 6.0% for plasma IGF-1, 4.7% and 8.0% for plasma T<sub>4</sub> and 7.8% and 8.2% for plasma T<sub>3</sub>.

Plasma NEFA concentrations were measured in foals in duplicate with an enzymatic-colorimetric method using a Cobas Mira-analyzer with a commercial kit (Roche, Mannheim, Germany) as previously described (8). The minimum level of detection was 10  $\mu$ mol/L. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.7% and 4.5%, respectively. Plasma leptin concentrations were measured in mares and foals in duplicate with a homologous double-antibody RIA as previously described

(8). The limit of detection was 1.0 ng/ml. The intra-assay coefficient of variation was less than 10%.

Plasma insulin concentrations during glucose metabolism tests were measured in duplicate with a double antibody RIA as previously described (15). The minimum level of detection was 0.1 pg/mL. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.2% and 5.8%, respectively.

### **Statistical analysis**

All results are expressed as median [quartile 1 – quartile 3] and presented as curves (median and interquartile range) or boxplots (minimum to maximum). Statistical analyses were carried out using R software ([www.r-project.org/](http://www.r-project.org/), version i386 2.15.2). Three questions were analyzed : 1) effect of the breed (P-P vs S-S), 2) effect of increased fetal growth in pony foals (P-P vs P-D) and 3) effect of either restricted or increased fetal growth in saddlebred foals (S-P vs S-S vs S-D).

Non-parametric statistical analyses were used. For non-repeated measurements, the Mann-Whitney test was applied for questions 1 (P-P vs S-S) and 2 (P-D vs P-P) and the Kruskal-Wallis test, followed by the NDWD *post-hoc* test, was used for question 3 (S-P vs S-S vs S-D), using the coin plug-in for R commander [33]. Repeated measures were analyzed by non-parametric ANOVA using the F1 LD F1 model of the nparLD function, followed by paired comparison [34]. Mann-Whitney or Kruskal-Wallis followed by the NDWD *post-hoc* tests, as appropriate, were then applied at each time point. All p-values were adjusted using the FDR (Benjamini-Hochberg) method. Effects were considered significant when p-value<0.05.

## RESULTS

### Breed effects in control foals

The body weight of all control foals increased significantly over the 360-day period ( $p < 0.001$ ), but the weight gain of P-P foals was significantly less than S-S foals (+68.0 kg [66.0-78.5] in P-P vs +123.6 kg [103.7-143.8] in S-S,  $p < 0.001$ ). P-P foals were always significantly lighter than S-S foals (-36.8%, -40.0%, -45.5% and -44.2% on days 180, 270, 360 and 540, respectively;  $p < 0.001$  at each age) (Figure 1A).

Plasma IGF-1,  $T_4$  and  $T_3$  concentrations decreased significantly in all control foals over the 360-day period ( $p < 0.0001$ ). P-P foals had significantly higher plasma IGF-1 concentrations than S-S foals at all stages ( $p < 0.001$  at each sampling time). Plasma  $T_4$  concentrations were significantly higher in P-P than in S-S foals on day 360 ( $p = 0.014$ ) and plasma  $T_3$  concentrations were significantly higher in P-P than in S-S foals on day 180 ( $p < 0.001$ ) (Figure 2A, 3A et 4A).  $T_3/T_4$  ratios were also higher in P-P than in S-S foals on days 180 and 360 ( $p = 0.013$  and  $p = 0.014$ ).

Plasma NEFA concentrations were significantly reduced in P-P foals vs S-S foals at all stages ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.006$  and  $p = 0.034$  on days 180, 360 and 540, respectively) (Figure 5A). Leptin concentrations decreased over the 360-day period ( $p < 0.001$ ), but were not different between both control groups at any stage.

P-P foals always had significantly higher fasting plasma glucose than S-S foals ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.016$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.001$  on days 180, 200, 360 and 540, respectively) (Figure 6A). P-P foals also had significantly higher glucose AUC and higher glucose increment than S-S foals during IVGTT on day 360 ( $p = 0.009$  and  $p < 0.001$ ), as well as lower glucose metabolism rate than S-S foals during clamps on

day 540 (Figure 7A, 7B and 7C), indicating a higher insulin sensitivity in S-S vs P-P foals.

### **Effect of increased fetal growth in pony foals**

As for controls, the body weight of P-D foals increased significantly over the 360-day period ( $p < 0.001$ ). There was no significant difference between the two groups for body weight gain over the period studied (+70.4 kg [64.2-80.5] in P-D vs +68.0 kg [66.0-78.5] in P-P) and thus, P-D foals remained heavier than P-P controls (+37.0%,  $p = 0.001$ , +32.5%,  $p = 0.058$  and +29.4%,  $p = 0.017$ , on days 180, 360 and 540) (Figure 1B).

As for controls, plasma IGF-1,  $T_4$  and  $T_3$  concentrations decreased significantly in P-D foals over the 360-day period ( $p < 0.001$ ). IGF-1 and  $T_4$  concentrations remained unaffected by transfer in a draft mare, but  $T_3$  concentrations were significantly reduced in P-D vs P-P foals on day 180 ( $p = 0.026$ ) (Figure 2B, 3B and 4B).  $T_3/T_4$  ratios did not differ between the two groups over the 360-day period.

Plasma NEFA concentrations were always significantly higher in P-D vs P-P foals ( $p = 0.009$ ,  $p = 0.025$  and  $p = 0.009$  on days 180, 360 and 540, respectively) (Figure 5B). In contrast, there was no significant difference for plasma leptin concentrations at any stage.

Fasting glycemia was significantly reduced in P-D vs P-P controls at all stages but day 200 ( $p = 0.009$ ,  $p = 0.046$  and  $p = 0.005$  on days 180, 360 and 540, respectively) (Figure 6A). Nevertheless, glucose responses during IVGTT on day 360 and glucose metabolism rate during clamps on day 540 were not significantly different between the two groups (Figure 7A, 7B and 7C).



### **Effect of increased or reduced fetal growth in saddlebred foals**

As for controls, the body weight of S-P and S-D foals increased significantly over the 360-day period ( $p < 0.001$ ) and there was no significant difference in weight gain between the three saddlebred groups (+141.6 kg [135.3-158.3] in S-P vs +123.6 kg [103.7-143.8] in S-S vs +129.8 kg [107.5-135.9] in S-D). S-P foals did not differ from S-S controls in terms of body weight. They remained lighter than S-D foals on days 180 (-31.9%,  $p = 0.044$ ) and caught up with S-D foals thereafter, with no significant difference between both groups on days 270 and 360. S-P foals, however, tended to be lighter than S-D foals on day 540 (-16.9%,  $p = 0.097$ ). The body weight of S-D foals was not different from that of S-S controls (Figure 1C).

As for controls, plasma IGF-1,  $T_4$  and  $T_3$  concentrations decreased significantly over the 360-day period ( $p < 0.001$ ). IGF-1 and  $T_4$  concentrations remained unaffected by transfer either in a pony or a draft mare, but  $T_3$  concentrations were significantly increased in S-P vs S-D foals on day 180 ( $p < 0.001$ ) (Figure 2C, 3C and 4C). S-P foals also had significantly higher  $T_3/T_4$  ratios than S-D foals on day 180 ( $p < 0.001$ ).

Plasma NEFA concentrations were significantly reduced in S-P vs S-D foals on day 180 ( $p < 0.001$ ), but all 3 groups had similar NEFA concentrations on days 360 and 540 (Figure 5C). Plasma leptin concentrations decreased over the 360-day period ( $p < 0.001$ ), but there was no difference between groups at any time.

Fasting glycemia was significantly higher in S-P foals than S-D foals at all stages but on day 200 ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.010$  and  $p = 0.009$  on days 180, 360 and 540, respectively) (Figure 6A), but neither S-P nor S-D foals differed from S-S controls. All 3 groups had similar glucose AUC, but both S-P and S-D groups had significantly increased maximum glucose increment compared to S-S controls during IVGTT on

day 360 ( $p=0.002$  and  $p=0.042$ , respectively) (Figure 7A and 7B). All saddlebred groups had similar glucose metabolism rate during clamps on day 540 (Figure 7C).

## DISCUSSION

In the present study, experimental and control foals were monitored for growth and glucose metabolism parameters over one year after weaning at 6 months of age. The present data confirm that ponies differ from saddlebreds not only by their conformation, but also from a physiological and metabolic point of view. Although not described by Peugnet and colleagues [32], as expected in those breeds, the weight gain was significantly smaller in control pony foals than in control saddlebred foals from birth to weaning. Here, weaned ponies grew slower, were lighter, had higher plasma IGF-1 concentrations, had lower plasma NEFA concentrations and had higher fasting glycemia together with a reduced glucose metabolism compared to weaned saddlebreds all over the monitoring period. Thus, both breeds showed specific weight gain profiles over the 18 first months of extra-uterine life, as expected when selecting both breeds to establish the enhanced vs restricted fetal growth model. Breed specificities observed for plasma  $T_3$  concentrations at 6 months of age and for plasma  $T_4$  concentrations at 12 months of age, however, had vanished by 18 months of age.

Enhanced fetal growth induced by the transfer of pony or saddlebred embryos into draft mares had stronger effects in ponies than in saddlebreds, likely because of a larger difference of body size in pony vs draft mares compared to saddlebred vs draft mares. Enlarged P-D foals remained heavier than control P-P foals and their fasting glycemia matched that of saddlebred foals (*i.e.*, it was lower than control P-P

foals). Plasma NEFA concentrations were also increased throughout the monitoring period. Effects that were observed on plasma  $T_3$  concentrations at 6 months of age had vanished by 18 months of age and glucose metabolism was similar between both pony groups.

Restriction of fetal growth induced by the transfer of saddlebred embryos into pony mares did not affect the foals' post-weaning growth and metabolism when compared to control saddlebreds. Direct comparison of restricted S-P foals with S-D foals, however, highlighted some alterations of the studied parameters. Indeed, S-P foals were lighter than their S-D counterparts at 6 months of age, but caught up with them by 9 months of age and became undistinguishable from the rest of the saddlebred herd at the end of the monitoring period. Increased plasma  $T_3$  concentrations and decreased plasma NEFA concentrations at 6 months of age also returned to normal by 18 months of age. Finally, although S-P foals had higher fasting glycemia than S-D foals, their glucose metabolism was not different from the other saddlebred groups at 18 months of age.

Increased fetal growth was induced by transferring pony embryos into draft dams (+57% body weight at birth) [32]. Thereafter, the weight growth curve of P-D foals paralleled that of control ponies. As a consequence, P-D foals were still 29% heavier than control ponies at 18 months of age. Although Allen and colleagues also increased birth weight after the transfer of pony embryos into Thoroughbred mares (P-Th) foals with a 58% increase in body weight at birth) [26,35], in that experiment, the weight gain slowed down in P-Th foals compared to controls and thus, the two groups were not different from 9 to 28 months of age [26]. Thereafter, P-Th foals started to gain weight faster again and were 15% heavier than control ponies at the

end of the study at 36 months of age. An explanation could be found in the difference between the Thoroughbred and draft breeds in terms of body size (antenatal growth being a determinant factor of post-natal growth), but also in terms of milk yield, which is supposed to increase with breed size and therefore to be higher in draft compared to Thoroughbred mares [36,37]. Thus, effects of the increased intra-uterine space could be have been amplified post-natally in pony foals born to draft dams in the present study. The feeding management of the foals in both studies could also be questioned. In both studies, foals were weaned around 6 months of age, in pasture during summer months and supplemented with concentrates during the winter months (November to Mars inclusive). There is not enough nutritional data available, however, to take this comparison forward.

S-D foals were undistinguishable from control saddlebreds in terms of body weight in both the pre- [32] and post-weaning period. We hypothesize that the size difference between the saddlebred and draft breeds was not large enough to impact significantly on growth patterns.

On the other side, intra-uterine growth retardation (IUGR) was induced by transferring saddlebred embryos into pony dams (-37% and -42% body weight at birth compared to S-S and S-D foals, respectively) [32]. S-P foals caught up with control saddlebreds within the 1<sup>st</sup> month after birth [32] and with S-D foals between weaning at 6 months of age and 9 months of age. Only a tendency for lower body weight in S-P vs S-D foals was found at the end of the study (-17% at 18 months of age). Allen and colleagues also observed fetal growth retardation in Thoroughbred-in-pony (Th-P) foals (-37% body weight at birth compared to control Thoroughbreds), but catch-up growth occurred later than in the present work (around 14 months of age) [26]. These observations are consistent with previous reports of accelerated

growth in the first months of post-natal life in IUGR children [38-40] or in the 2<sup>nd</sup> month of post-natal life in IUGR lambs induced by placental restriction [41-44]. Interestingly, placental restriction was demonstrated in restricted Th-P foals, with lighter placentas, with a reduced exchange surface area and reduced volume [35].

Catch-up growth in restricted S-P foals could be linked to the increased plasma T<sub>3</sub> concentrations (as compared to S-D foals) before weaning. This phenomenon was indeed observed in placentally restricted IUGR lambs that had increased plasma T<sub>3</sub> concentrations between 15 and 25 days of age, which corresponds to the period of maximal catch-up growth in this model [45]. Moreover, the plasma T<sub>3</sub> concentrations in spontaneous IUGR lambs correlate positively with subsequent weight gain in the 1<sup>st</sup> month postpartum [46].

Catch-up growth has been related to increased adiposity in later life in humans [47] and to an increased proportion of perirenal fat in 45-day old lambs born after placental restriction [43]. Here, no direct measurement of body composition was made in foals, but we measured plasma leptin concentrations, which are closely related to fat stores in horses [48,49], but no difference was observed between groups. Therefore, it would be reasonable to assume that fat deposit was similar between experimental and control groups. Surprisingly, increased plasma NEFA concentrations in P-D vs P-P foals and decreased plasma NEFA concentrations in S-P vs S-D foals were observed in the post-weaning period. The exact opposite was shown in terms of plasma glucose concentrations which were decreased in P-D vs P-P foals and increased in S-P vs S-D foals. The modification of fetal growth,

together with a different post-natal environment, therefore induced different adaptive responses of the “glucose-fatty acids cycle” proposed by Randle and colleagues [50].

IGF-1, thyroid hormones and NEFA are key factors for post-natal growth and maturation. In the five groups, plasma IGF-1 concentrations peaked at 90 days of age then decreased until 18 months of age where they were at their lowest. Both plasma T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> concentrations were highest at birth then continuously decreased until 18 months of age. Control pony foals had higher plasma IGF-1 concentrations than control saddlebreds from birth to 18 months of age, whereas plasma T<sub>3</sub> concentrations were increased only in the pre-weaning period [32]. Plasma IGF-1 concentrations remained unaffected by embryo transfers in either a pony or a draft mares until 18 months of age. On the opposite, enhanced P-D and restricted S-P foals demonstrated respectively decreased and increased plasma T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> concentrations compared to their respective controls in the pre-weaning period. Those effects vanished in the post-weaning period.

Here, we confirm innate differences between breeds in terms of glucose and insulin dynamics. Indeed, shortly after birth, glucose clearance and insulin secretion in response to intravenous glucose was the same between both breeds [32]. We have previously shown that control ponies were largely hyperglycemic compared to control saddlebreds from 1 month of age and insulin sensitivity was markedly decreased shortly after weaning as demonstrated by hyperinsulinemic euglycemic clamps [32]. Here, hyperglycemia together with decreased insulin sensitivity in control ponies was confirmed until 18 months of age. Therefore it seems that breed specificities in terms of glucose homeostasis are established in the 1<sup>st</sup> month

*postpartum*. Glucose intolerance and increased insulin secretion in response to oral glucose has been described in ponies with a previous history of laminitis [51], as well as in healthy Shetland ponies (2 to 8 years old) who also decreased insulin sensitivity during hyperinsulinemic euglycemic clamps [52] and again, in healthy ponies (5 to 16 years old) using frequently sampled intravenous glucose tolerance tests [53].

An increased insulin secretion was observed after intravenous glucose infusion in enhanced P-D foals vs control ponies in the immediate post-natal period, consistent with an early decreased insulin sensitivity [32], just like P-Th foals [27]. This was preserved until 18 months of age where both pony groups were similar to each other in terms of insulin sensitivity. P-D foals, however, were still hypoglycemic ponies at this age. Lambs born after a therapeutic manipulation causing accelerated fetal growth [54] also exhibited an increased insulin secretion in response to intravenous glucose in the 2<sup>nd</sup> month *postpartum* [55].

Growth retarded S-P foals were consistently hyperglycemic saddlebreds from 1 to 18 months of age. They showed decreased insulin secretion in response to intravenous glucose injection shortly after birth and increased insulin sensitivity as demonstrated by hyperinsulinemic euglycemic clamps shortly after weaning [32]. At 18 months of age, however, S-P foals were as sensitive to insulin as control saddlebreds. This consistent with observations of naturally IUGR piglets which had normal glucose and insulin responses to intravenous glucose at 3 months of age and poor glucose tolerance at adult age (12 months of age) [9] and even more consistent with data from placental restricted lambs which had increased insulin sensitivity until 1 month of age [10,44]. Then adult male sheep had reduced insulin sensitivity with decreased insulin secretion due to impaired  $\beta$  cell function [10,56]. A mechanism for

the transition from enhanced to reduced insulin sensitivity was shown in a rat model of placental restriction by uterine artery ligation in late pregnancy. Progressive silencing of the *Pdx1* gene by epigenetic marks (reduction of histone acetylation and increase of DNA methylation at the promoter level) gradually impacts pancreatic development and cell differentiation [57].

## REFERENCES

1. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, et al. (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341: 938-941.
2. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, et al. (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62-67.
3. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ (1989) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2: 577-580.
4. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, et al. (1998) Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351: 173-177.
5. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 70: 811-816.
6. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, et al. (2001) Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol* 185: 93-98.



7. McMullen S, Mostyn A (2009) Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. *Proc Nutr Soc* 68: 306-320.
8. McMillen IC, Robinson JS (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85: 571-633.
9. Poore KR, Fowden AL (2002) The effect of birth weight on glucose tolerance in pigs at 3 and 12 months of age. *Diabetologia* 45: 1247-1254.
10. Gatford KL, Mohammad SN, Harland ML, De Blasio MJ, Fowden AL, et al. (2008) Impaired beta-cell function and inadequate compensatory increases in beta-cell mass after intrauterine growth restriction in sheep. *Endocrinology* 149: 5118-5127.
11. Forhead AJ, Broughton Pipkin F, Fowden AL (2000) Effect of cortisol on blood pressure and the renin-angiotensin system in fetal sheep during late gestation. *J Physiol* 526 Pt 1: 167-176.
12. Poore KR, Fowden AL (2003) The effect of birth weight on hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in juvenile and adult pigs. *J Physiol* 547: 107-116.
13. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ (2006) Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* 21: 29-37.
14. Bennett PH, Burch TA, Miller M (1971) Diabetes mellitus in American (Pima) Indians. *Lancet* 2: 125-128.
15. Frayling TM, Hattersley AT (2001) The role of genetic susceptibility in the association of low birth weight with type 2 diabetes. *Br Med Bull* 60: 89-101.
16. Lindsay RS, Dabelea D, Roumain J, Hanson RL, Bennett PH, et al. (2000) Type 2 diabetes and low birth weight: the role of paternal inheritance in the association of low birth weight and diabetes. *Diabetes* 49: 445-449.

17. McCance DR, Pettitt DJ, Hanson RL, Jacobsson LT, Knowler WC, et al. (1994) Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ* 308: 942-945.
18. Ozanne SE, Hales CN (2002) Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13: 368-373.
19. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, et al. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7: 847-854.
20. Rosedale PD, Ousey, J.C. (2002) Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR. *Equine Veterinary Education* 14: 98-112.
21. Ansari T, Beech D, Sibbons PD, Rosedale PD, Ousey JC, et al. Pilot investigations into microanatomical defects associated with IUGR in the horse and other domestic animals.; 1998; Sydney, Australia. The Dorothy Havermeyer Foundation. pp. 15.
22. Walton A, Hammond J (1938) The maternal effects on growth and conformation in shire horse-shetland pony crosses. *Proc R Soc Lond B* 125: 311-335.
23. Tischner M (1985) Embryo recovery from Polish-pony mares and preliminary observations on foal size after transfer of embryos to large mares. *Equine vet J* 3: 96-98.
24. Tischner M, Klimczak M (1989) The development of polish ponies born after embryo transfer to large recipients. *Equine vet J* 21: 62-63.
25. Allen WR, Wilsher S, Stewart F, Stewart F, Ousey J, et al. (2002) The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. *J Endocrinol* 172: 237-246.

26. Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM (2004) The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction* 127: 67-77.
27. Forhead AJ, Ousey JC, Allen WR, Fowden AL (2004) Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *J Endocrinol* 181: 459-467.
28. Ousey JC, Rossdale PD, Fowden AL, Palmer L, Turnbull C, et al. (2004) Effects of manipulating intrauterine growth on post natal adrenocortical development and other parameters of maturity in neonatal foals. *Equine Vet J* 36: 616-621.
29. Giussani DA, Forhead AJ, Gardner DS, Fletcher AJ, Allen WR, et al. (2003) Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *J Physiol* 547: 67-76.
30. George LA, Staniar WB, Treiber KH, Harris PA, Geor RJ (2009) Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. *Domest Anim Endocrinol* 37: 23-29.
31. van der Heyden L, Lejeune JP, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, et al. (2013) Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *Veterinary record* 172: 68.
32. Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, et al. (2014) Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses. *PLoS One* 9: e102044.
33. Horhorn T, Hornik K, van de Will M, Zeileis A (2006) A lego system for conditional inference. *The American Statistician* 60: 257-263.

34. Noguchi K, Gel Y, Brunner R, Konietschke F (2012) nparLD: an R software package for non parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *Journal of Statistical Software* 50: 1-23.
35. Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, et al. (2002) Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* 123: 445-453.
36. Doreau M, Boulot S (1989) Recent knowledge on mare milk production: a review. *Livestock production science* 22: 213-235.
37. Doreau M, Boulot S (1989) Methods of measurement of milk yield and composition in nursing mares: a review. *Lait* 69: 159-171.
38. Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, et al. (1995) Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res* 38: 267-271.
39. Karlberg J, Albertsson-Wikland K (1995) Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res* 38: 733-739.
40. Karlberg JP, Albertsson-Wikland K, Kwan EY, Lam BC, Low LC (1997) The timing of early postnatal catch-up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Horm Res* 48 Suppl 1: 17-24.
41. Alexander G (1964) Studies on the Placenta of the Sheep (*Ovis Aries* L.). Effect of Surgical Reduction in the Number of Caruncles. *J Reprod Fertil* 7: 307-322.
42. Wigglesworth JS (1964) Experimental Growth Retardation in the Foetal Rat. *J Pathol Bacteriol* 88: 1-13.
43. De Blasio MJ, Gattford KL, McMillen IC, Robinson JS, Owens JA (2007) Placental restriction of fetal growth increases insulin action, growth, and adiposity in the young lamb. *Endocrinology* 148: 1350-1358.

44. De Blasio MJ, Gatford KL, Robinson JS, Owens JA (2007) Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R875-886.
45. De Blasio MJ, Gatford KL, Robinson JS, Owens JA (2006) Placental restriction alters circulating thyroid hormone in the young lamb postnatally. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1016-1024.
46. Cabello G, Levieux D (1981) Hormonal status in the newborn lamb (cortisol, T3, T4). Relationships to the birth weight and the length of gestation: effect of the litter size. *Biol Neonate* 39: 208-216.
47. Rogers I, Group E-BS (2003) The influence of birthweight and intrauterine environment on adiposity and fat distribution in later life. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 755-777.
48. Gentry LR, Thompson DL, Jr., Gentry GT, Jr., Davis KA, Godke RA, et al. (2002) The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *J Anim Sci* 80: 2695-2703.
49. Buff PR, Dodds AC, Morrison CD, Whitley NC, McFadin EL, et al. (2002) Leptin in horses: tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *J Anim Sci* 80: 2942-2948.
50. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789.
51. Jeffcott LB, Field JR, McLean JG, O'Dea K (1986) Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. *Equine Vet J* 18: 97-101.

52. Rijnen KE, van der Kolk JH (2003) Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies. *Am J Vet Res* 64: 1260-1264.
53. Bamford NJ, Potter SJ, Harris PA, Bailey SR (2014) Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. *Domest Anim Endocrinol* 47: 101-107.
54. Carr DJ, Aitken RP, Milne JS, Mehta V, Peebles DM, et al. (2012) Prenatal Ad.VEGF gene therapy increases fetal growth velocity and alters uterine artery vascular reactivity in the absence of a measurable effect on uterine blood flow in a sheep model of fetal growth restriction. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 97.
55. Carr DJ, Aitken RP, Milne JS, Peebles DM, Zachary I, et al. (2011) Alterations in postnatal growth and metabolism following prenatal treatment of intrauterine growth restriction with Ad.VEGF gene therapy in the sheep. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 96: 2011.
56. Owens JA, Thavaneswaran P, De Blasio MJ, McMillen IC, Robinson JS, et al. (2007) Sex-specific effects of placental restriction on components of the metabolic syndrome in young adult sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1879-1889.
57. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA (2008) Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest* 118: 2316-2324.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Joseph Bellonie, Patrice Dupuis, Philippe Barrière, Thierry Gascogne, Thierry Blard, Yvan Gaudé and François Stieau for care and management of the horses and for assistance during metabolic tests and to Françoise Ternois for management of the NEFA assays.

## FIGURES

**FIGURE 1.** Body weight from weaning to 18 months of age in the five groups. A: P-P (●) vs S-S (■). B: P-P (●) vs P-D (○). C: S-P (▼) vs S-S (■) vs S-D (Δ). (P-P: Pony-in-Pony, P-D: Pony-in-Draft, S-P: Saddlebred-in-Pony, S-S: Saddlebred-in-Saddlebred, S-D: Saddlebred-in-Draft). Curves are presented as medians and interquartile ranges. In graphs A and B, \* indicate a significant difference between both groups (F1 LD F1 model followed by Mann-Whitney test and adjusted with Bonferroni Hochberg FDR,  $p < 0.05$ ). In graph C, \* indicate a significant difference between S-P and S-D (F1 LD F1 model followed by Kruskal-Wallis test and adjusted with Bonferroni Hochberg FDR,  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 2.** Plasma IGF-1 concentrations from weaning to 18 months of age in the five groups. A: P-P (plain yellow) vs S-S (plain green). B: P-P (plain yellow) vs P-D (chequered blue). C: S-P (striped pink) vs S-S (plain green) vs S-D (chequered red). (P-P: Pony-in-Pony, P-D: Pony-in-Draft, S-P: Saddlebred-in-Pony, S-S: Saddlebred-in-Saddlebred, S-D: Saddlebred-in-Draft). \* indicate a significant difference between

groups (F1 LD F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test and adjusted with Bonferroni Hochberg FDR,  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 3.** Plasma  $T_4$  concentrations from weaning to 18 months of age in the five groups. A: P-P (plain yellow) vs S-S (plain green). B: P-P (plain yellow) vs P-D (chequered blue). C: S-P (striped pink) vs S-S (plain green) vs S-D (chequered red). (P-P: Pony-in-Pony, P-D: Pony-in-Draft, S-P: Saddlebred-in-Pony, S-S: Saddlebred-in-Saddlebred, S-D: Saddlebred-in-Draft). \* indicate a significant difference between groups (F1 LD F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test and adjusted with Bonferroni Hochberg FDR,  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 4.** Plasma  $T_3$  concentrations from weaning to 18 months of age in the five groups. A: P-P (plain yellow) vs S-S (plain green). B: P-P (plain yellow) vs P-D (chequered blue). C: S-P (striped pink) vs S-S (plain green) vs S-D (chequered red). (P-P: Pony-in-Pony, P-D: Pony-in-Draft, S-P: Saddlebred-in-Pony, S-S: Saddlebred-in-Saddlebred, S-D: Saddlebred-in-Draft). \* indicate a significant difference between groups (F1 LD F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test and adjusted with Bonferroni Hochberg FDR,  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 5.** Plasma NEFA concentrations from weaning to 18 months of age in the five groups. A: P-P (plain yellow) vs S-S (plain green). B: P-P (plain yellow) vs P-D (chequered blue). C: S-P (striped pink) vs S-S (plain green) vs S-D (chequered red). (P-P: Pony-in-Pony, P-D: Pony-in-Draft, S-P: Saddlebred-in-Pony, S-S: Saddlebred-in-Saddlebred, S-D: Saddlebred-in-Draft). \* indicate a significant difference between



groups (F1 LD F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test and adjusted with Bonferroni Hochberg FDR,  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 6.** Fasting glycemia from weaning to 18 months of age in the five groups. A: P-P (plain yellow) vs S-S (plain green). B: P-P (plain yellow) vs P-D (chequered blue). C: S-P (striped pink) vs S-S (plain green) vs S-D (chequered red). (P-P: Pony-in-Pony, P-D: Pony-in-Draft, S-P: Saddlebred-in-Pony, S-S: Saddlebred-in-Saddlebred, S-D: Saddlebred-in-Draft). Curves are presented as medians and interquartile ranges. In graphs A and B, \* indicate a significant difference between both groups (F1 LD F1 model followed by Mann-Whitney test and adjusted with Bonferroni Hochberg FDR,  $p < 0.05$ ). In graph C, \* indicate a significant difference between S-P and S-D (F1 LD F1 model followed by Kruskal-Wallis test and adjusted with Bonferroni Hochberg FDR,  $p < 0.05$ ).

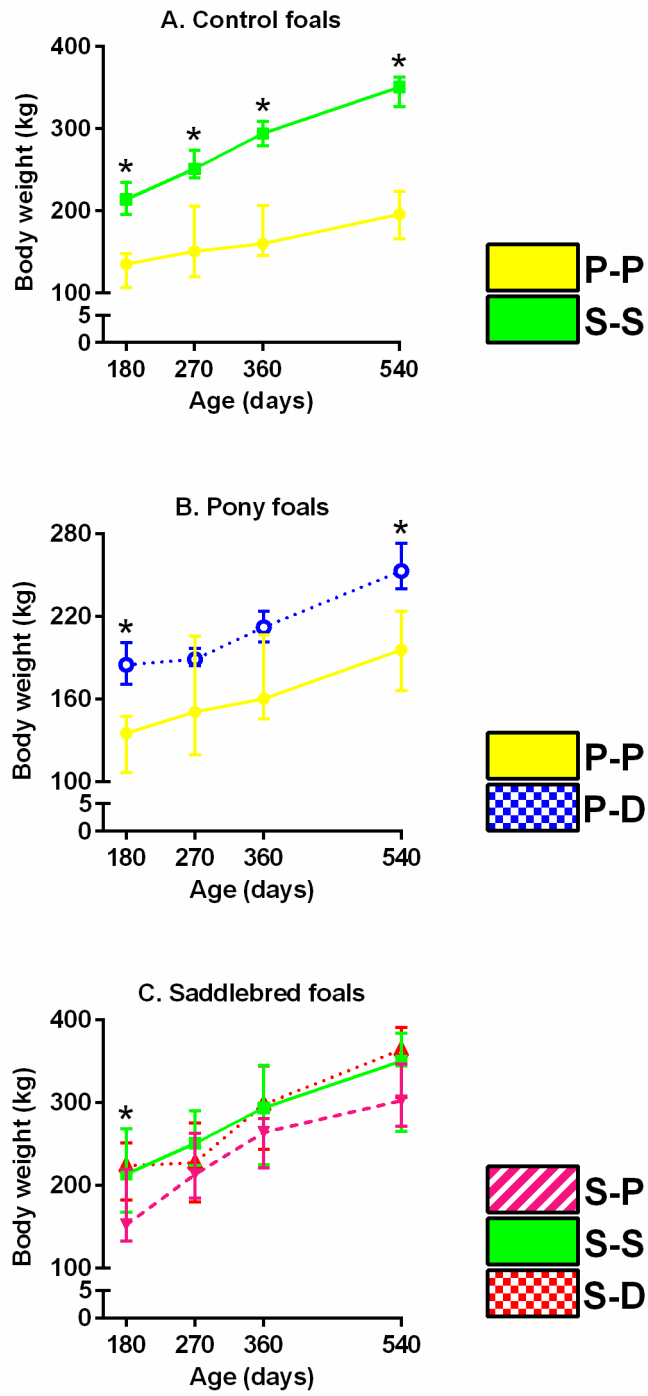
**FIGURE 7.** Glucose parameters during metabolic tests in the five groups. A: Glucose area under the curve during IVGTT on day 360. B: Maximum glucose increment during IVGTT on day 360. C: Glucose metabolism rate during hyperinsulinemic euglycemic clamps on day 540. (P-P: Pony-in-Pony (plain yellow), P-D : Pony-in-Draft (chequered blue), S-P: Saddlebred-in-Pony (striped pink), S-S: Saddlebred-in-Saddlebred (plain green), S-D: Saddlebred-in-Draft (chequered red)). \* indicate a significant difference between groups (F1 LD F1 model followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ).

**TABLE 1.** Number of foals monitored after weaning and until 18 months of age with sex ratio within the five groups.

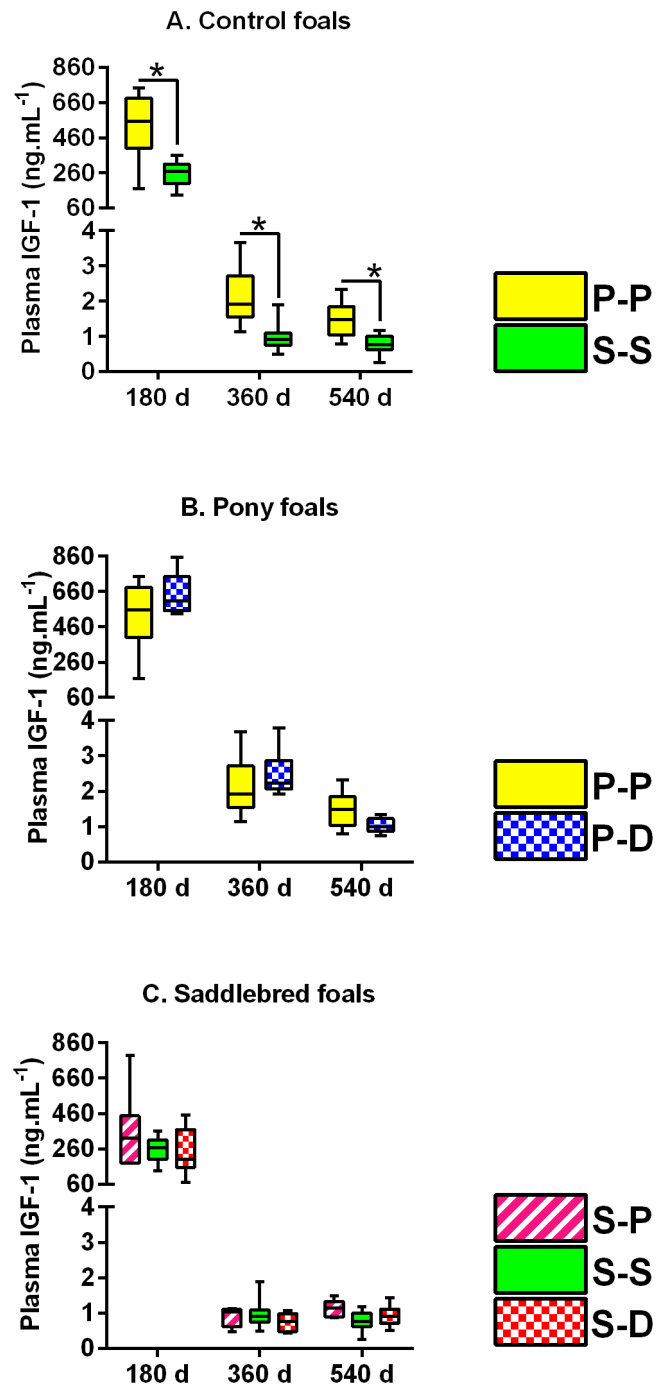
		<b>P-P</b>	<b>P-D</b>	<b>S-P</b>	<b>S-S</b>	<b>S-D</b>
Number of foals monitored	Born in 2011	5	5	2	13	8
	Born in 2012	6	1	4	8	0
	<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>21</b>	<b>8</b>
Number of females / number of males		6 / 5	4 / 2	2 / 4	13 / 8	6 / 2

(P-P: Pony-in-Pony, P-D: Pony-in-Draft, S-P: Saddlebred-in-Pony, S-S: Saddlebred-in-Saddlebred, S-D: Saddlebred-in-Draft).

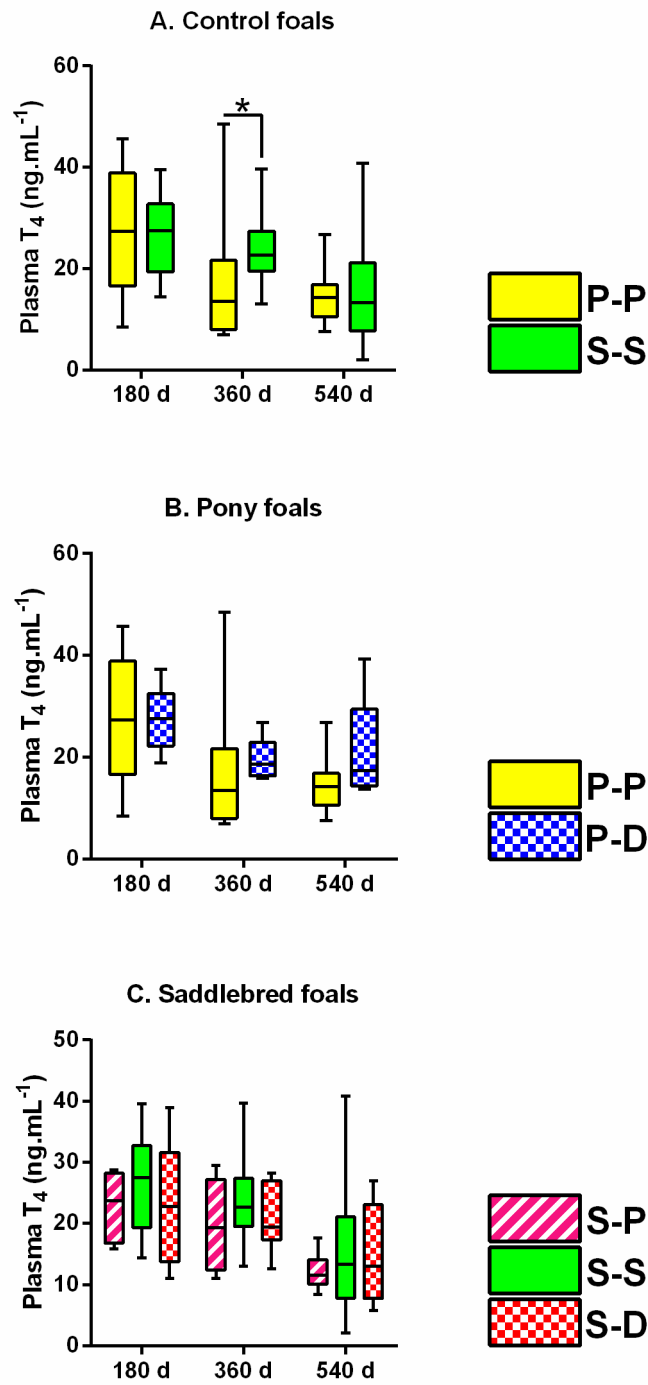
**FIGURE 1**



**FIGURE 2**



**FIGURE 3**



**FIGURE 4**

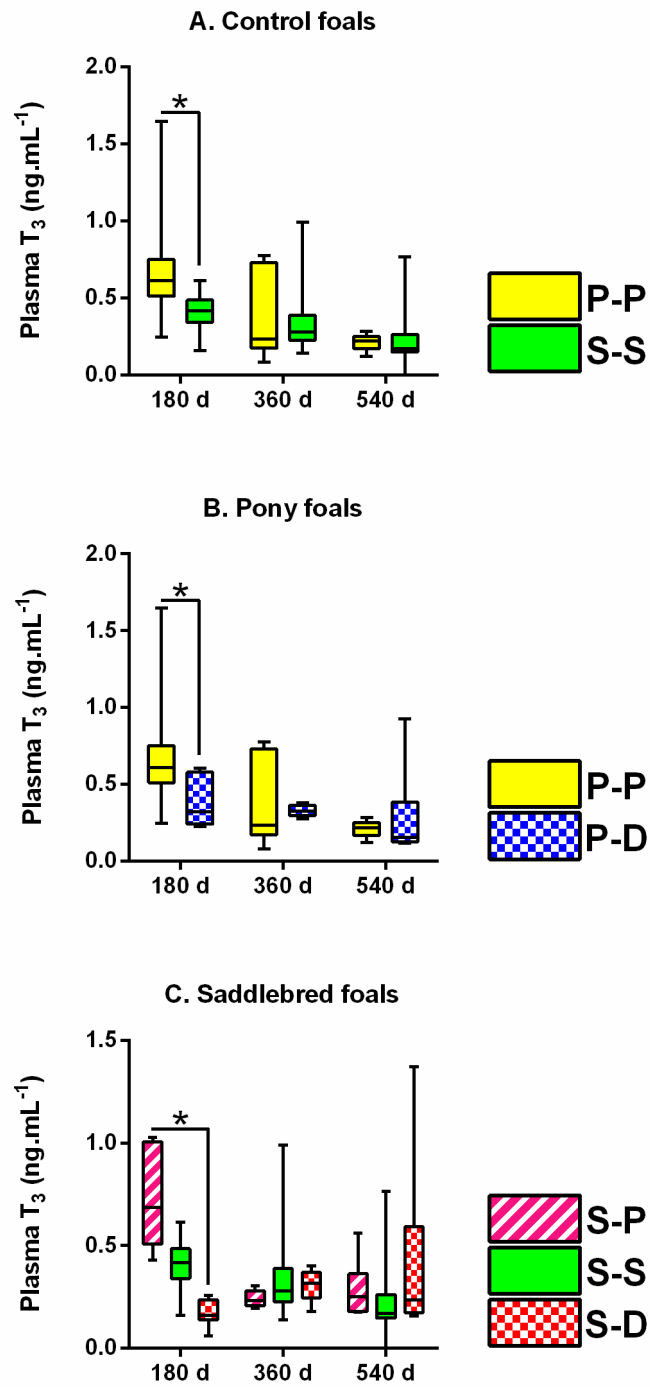
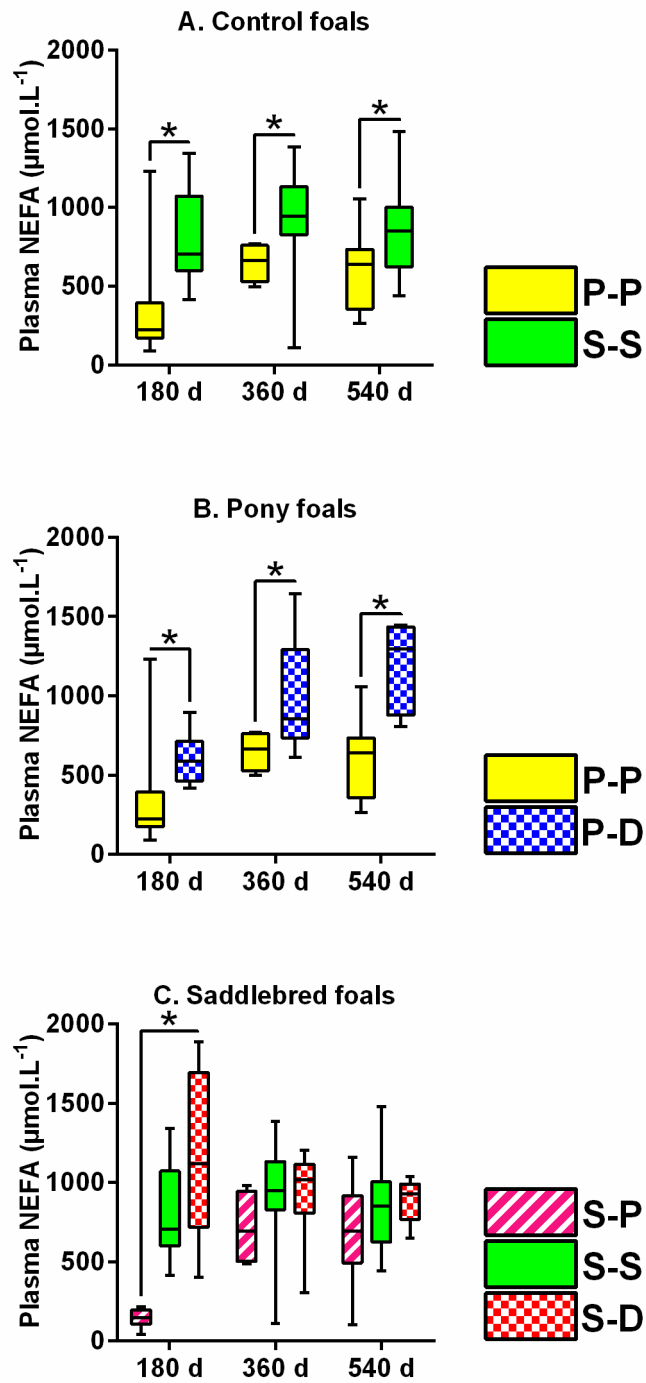


FIGURE 5



**FIGURE 6**

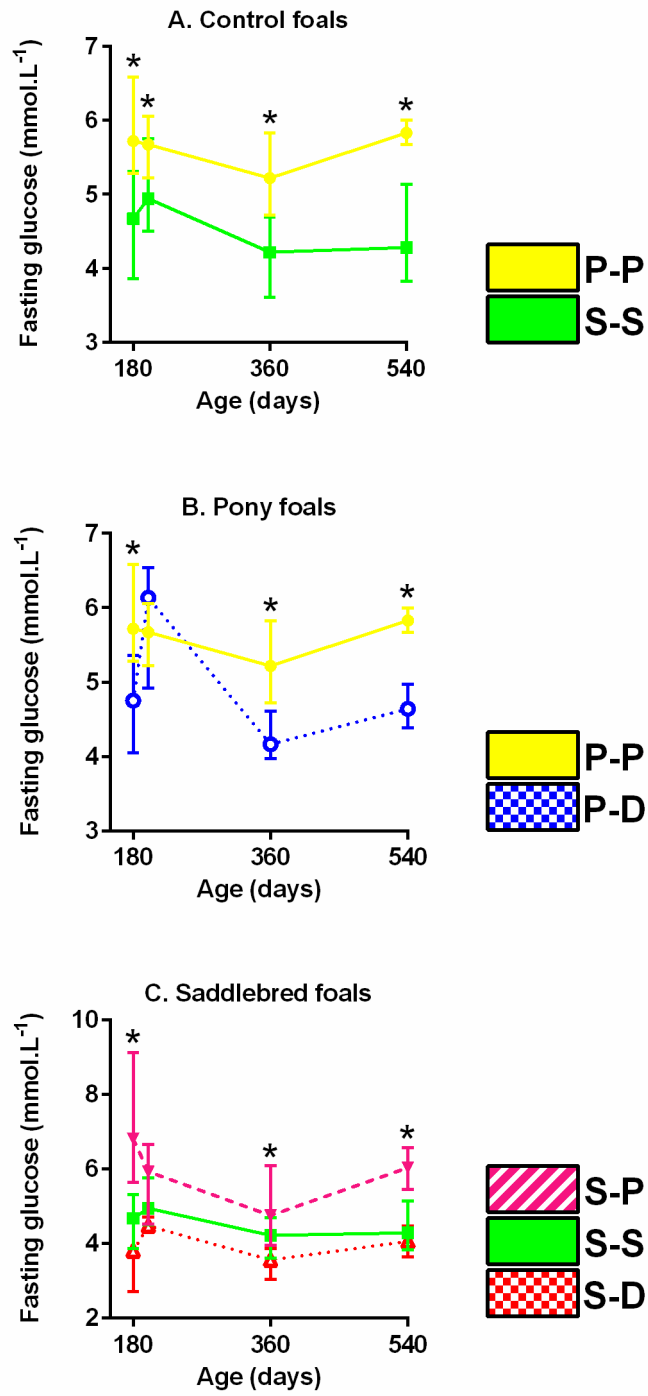
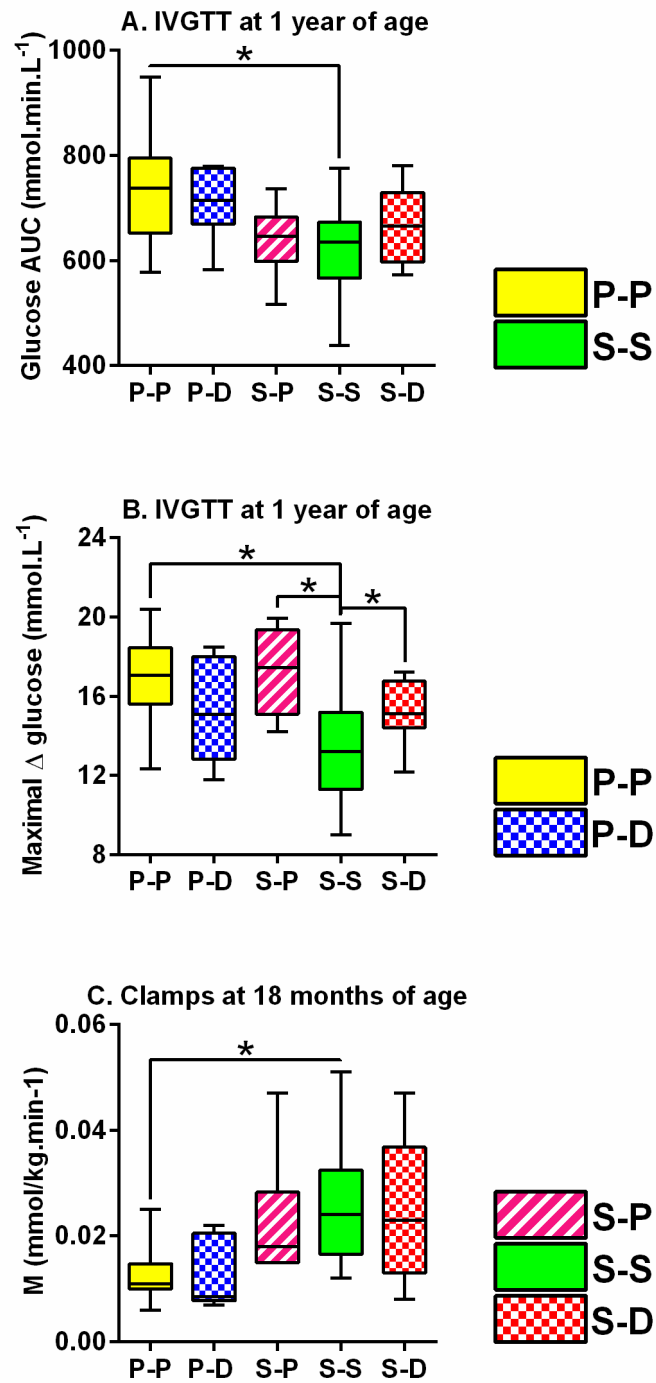




FIGURE 7



## **2.4. Article: “Longitudinal study of growth and osteoarticular status in foals born to between-breed embryo transfers”**

**Peugnet P**, Mendoza L, Wimmel L, Duchamp G, Dubois C, Reigner F, Caudron I, Delière B, Toquet MP, Sandersen C, Chaffaux S, Tarrade A, Richard E, Lejeune JP, Sertheyn D, Chavatte-Palmer P

*Article en relecture auprès des co-auteurs pour soumission à Journal of Animal Science.*



**Longitudinal study of growth and osteoarticular status in foals born to between-breed embryo transfers<sup>1</sup>**

**P. Peugnet\***, **L. Mendoza†**, **L. Wimmel‡**, **G. Duchamp§**, **C. Dubois‡**, **F. Reigner§**,  
**I. Caudron†**, **B. Delière†**, **M.P. Toquet#**, **C. Sandersen†**, **S. Chaffaux\***, **A. Tarrade\***,  
**E. Richard#**, **J.P. Lejeune†**, **D. Serteyn†**, **P. Chavatte-Palmer\*<sup>2</sup>**

\*INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France; † Clinique Equine, Faculté de Médecine Vétérinaire, CORD, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgium; ‡ IFCE, Station Expérimentale de la Valade, F-19370 Chamberet, France; § INRA, UE1293, F-37380 Nouzilly, France; # Normandie Université, UNICAEN, SF 4206 ICORE / LABÉO Frank Duncombe Laboratory, F-14000 Caen, France

---

<sup>1</sup> This research was funded by the “Institut du Cheval et de l’Equitation” under grant name FOETALIM and by the French Institute for Agricultural Research (INRA) department “Physiology and Breeding Systems”. The author thank Dr. Isabelle Levy, Dr. Claudia Dominici, Dr. Valérie Aufils and Dr. Marie Heng for management of x-rays in foals, Joseph Bellonie, Patrice Dupuis, Philippe Barrière, Thierry Gascogne, Thierry Blard, Yvan Gaudé and François Stieau for care and management of mares and foals and assistance during x-rays, as well as veterinary students, in particular Sandra Martin.

<sup>2</sup> pascal.chavatte@jouy.inra.fr / INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Bâtiment 230, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy en Josas, France.

## ABSTRACT

Embryo transfers between breeds of different sizes were carried out to investigate the role of early life events on growth, bone and cartilage turnover and predisposition to osteochondrosis (OC) in foals. Control pony and saddlebred pregnancies were obtained by artificial insemination (P-P, n=11 and S-S, n=21). Enhanced and restricted pregnancies were obtained by transferring pony or saddlebred embryos into draft dams (P-D, n=6 or S-D, n=8) or saddlebred embryos into pony dams (S-P, n=6). Control and experimental foals were raised by their dams and recipient mares, respectively, and weaned at 6 months of age. Body measurements were recorded from birth to 18 months of age. Serum concentrations of osteocalcin, bone-specific alkaline phosphatase (b-AIP), C-telopeptide of type II collagen (CTX-II) and hydroxyproline were measured. X-rays were performed shortly after weaning and at 18 months of age for evaluation of OC status. Fetal growth was enhanced in P-D foals (+61% body weight,  $p=0.005$  and +16% withers' height,  $p=0.004$  at birth) with overgrowth of most body segments. As a result, P-D foals were still 30% heavier and 9% taller at 18 months of age ( $p=0.024$  and  $p=0.003$ ). Transient pre-weaning reduction of osteocalcin, b-AIP and hydroxyproline concentrations were observed in oversized foals ( $p=0.005$ ,  $p=0.059$  and  $p=0.004$ ). In contrast, fetal growth was restricted in S-P foals (-42% body weight,  $p<0.001$  and -12% withers' height,  $p=0.005$  at birth) compared to S-D foals. Some body measurements of S-P foals (body weight, shoulder and hip width) grew slower before weaning but subsequently caught up after weaning. Others, however, did not catch up, resulting in reduced body weight (-17%;  $p=0.033$ ) and withers' height (-5%;  $p=0.022$ ) in S-P compared to S-D foals at 18 months of age. Only osteocalcin serum concentrations varied in S-P foals compared to one or the other saddlebred groups, with decreased ( $p<0.001$ ) and increased ( $p=0.043$ ) concentrations shortly after birth levels and at weaning, respectively. The relative

risk of developing OC was increased in restricted S-P foals compared to S-S and S-D foals shortly after weaning (3.14,  $p < 0.001$  and 3.34,  $p = 0.026$ ). All S-P foals were OC positive just after weaning but only two of them were still OC-positive at 18 months of age. These data confirm the impact of the intra-uterine environment on growth and skeletal health in horses.

**Key words:** alkaline phosphatase, collagen, growth, horse, osteocalcin, osteochondrosis

## INTRODUCTION

The Developmental Origins of Health and Disease or developmental programming are based on the observations that alterations in fetal development caused by an environmental *stimulus* have long term impacts on post-natal development and determine the adult phenotype and predisposition to non-communicable disease (Barker and Osmond, 1986; Barker et al., 1989; Barker, 1990; Barker et al., 1993a; Barker et al., 1993b). As demonstrated by experimental models in foals, post-natal consequences of adverse intra-uterine conditions include alterations of growth patterns at least until 3 years of age (Allen et al., 2004; Peugnet et al., 2014) and alterations of insulin secretion and sensitivity, not only in the immediate *postpartum* period (Forhead et al., 2004; Ousey et al., 2008; Peugnet et al., 2014), but also several months later (George et al., 2009; Peugnet et al., 2014) and even beyond one year of age (Peugnet et al., in preparation). Besides, an epidemiological study recently showed a detrimental effect of feeding pregnant mares with concentrates on the development of osteochondrosis (OC) in their one- to three-year old offspring (van der Heyden et al., 2013). This supported the previous hypothesis of a fetal origin of OC (Rejno and Stromberg, 1978; Carlsten et al., 1993; Carlson et al., 1995; Henson et al., 1997; Olstad et al., 2007). As a matter of fact, the incidence of OC in foals has been related to postprandial hyperglycemia

and hyperinsulinemia (Glade and Belling, 1984), causing a defect in chondrocytes maturation and subsequent bone formation (Glade and Reimers, 1985; Henson et al., 1997). This has been investigated through epidemiological studies (Pagan et al., 2001) and the study of experimental foals fed high *vs* low energy rations (Glade and Belling, 1984; Savage et al., 1993; Ralston, 1996). To date, however, the fetal origin of OC has not been demonstrated experimentally.

We previously induced increased *vs* restricted fetal growth using embryo transfers between breeds of different sizes (ponies, saddlebreds and draft horses). Increased Pony-in-Draft foals developed an early resistance to insulin, whereas restricted Saddlebred-in-Pony foals demonstrated a higher sensitivity to insulin at weaning (Peugnet et al., 2014). The purpose of the present research was to explore the effects of between-breed embryo transfers on growth patterns and osteoarticular status in these foals. Body measurements and four biomarkers linked to bone and cartilage turnover (osteocalcin, bone-specific alkaline phosphatase, C-telopeptide of type II collagen and hydroxyproline), together with bone health, as assessed through radiographic examinations, were monitored from birth to 540 days of age.

## **MATERIALS AND METHODS**

Animal studies were approved by the local animal care and use committee (“Comité des Utilisateurs de la Station Expérimentale de Chamberet”) and received ethical approval from the local ethics committee (“Comité Régional d’Ethique pour l’Expérimentation Animale du Limousin”) under protocol number 5-2013-5.

## **Establishment of experimental and control groups**

Experimental and control groups were established over 2 successive breeding seasons (foaling in 2011 and 2012) using semen from 1 pony and 2 saddlebred stallions as previously described (Peugnet et al., 2014). Pony mares were located at the French Institute for Agricultural Science (INRA) experimental farm in Nouzilly, France (farm 1). Saddlebred and draft mares were located at the “Institut Français du Cheval et de l’Equitation” (IFCE) experimental farm in Chamberet, France (farm 2). Median mares’ age was 6.2 years (range 3.0 to 19.2 years). Both herds included primiparous and multiparous mares (up to 10 pregnancies). The distribution of mares between groups according to withers’ height, age and parity is shown in Table 1.

Following embryo recovery after ovulation in the pony and saddlebred donor mares and between-breed transfer of the embryos into synchronized pony and draft recipient mares, 6 Pony-in-Draft (P-D), 6 Saddlebred-in-Pony (S-P) and 8 Saddlebred-in-Draft (S-D) experimental foals were produced. Eleven Pony-in-Pony and 21 Saddlebred-in-Saddlebred control foals were produced by artificial insemination using the same stallions as for embryo production (Figure 1).

## **Management of mares and foals**

Planes of nutrition of mares and foals were previously reported (Peugnet et al., 2014) (and Peugnet et al., in preparation). They were fed according to current INRA recommendations for pregnant and lactating mares and for growing foals (Martin-Rosset, 2012). Briefly, pregnant mares were kept on pasture from first pregnancy diagnosis at 14 days (spring) until November, when they were housed in boxes and fed a diet based on straw and



hay complemented with concentrates (soybean or commercial pellets (Eperon, Tellus Nutrition Animale, France) with free access to mineral salts on farm 1 and either homemade pellets containing barley, soybean cake, molasses, minerals and vitamins or moha hay on farm 2). The pregnant mares' diet was adjusted to requirements according to body weight and month of pregnancy.

After foaling, all mares and their foals returned to grazing. Experimental and control foals were raised by their surrogate mother or biological dam, respectively. At each farm, fillies and colts were managed in one group in the same pasture until weaning at 6 months of age. From weaning, foals were housed together in open barns and fed a diet based on straw and hay complemented with concentrates (oat and soybean cake with free access to mineral salts on farm 1 and homemade pellets containing barley, soybean cake, molasses, minerals and vitamins on farm 2). All colts were gelded around 9 months of age. From 12 months of age, fillies and geldings were conducted in one group in the same pasture until 18 months of age. At this time, they were housed in open barns again and fed concentrates (commercial pellets (Eperon, Tellus Nutrition Animale, France) on farm 1 or hay and the same diet as described above in terms of feedstuff on farm 2), quantitatively adjusted to their current stage of growth (Martin-Rosset, 2012). Foals were vaccinated and dewormed as for standard care.

### **Body measurements in foals**

Foals were weighed on the day after birth, at 3 and 15 days of age, then at monthly intervals until weaning at 180 days of age and thereafter at 270, 360 and 540 days of age. Others body measurements were made at the same ages but for 3 and 15 days of age. Measurements were made with the foal standing quietly on a flat floor. Withers' height, as well as shoulder and hip width were measured using a measuring rod. The length of the left

front leg was determined using a tape measure as the perpendicular distance from elbow to floor. Chest circumference immediately caudal to the withers was measured using a flexible tape measure. Width of the left front cannon bone was determined at the smallest circumference of the cannon bone using a Vernier caliper. Daily body weight and withers' height gain were calculated for 1-month periods from 1 to 180 days of age and then from 180 to 270, 270 to 360 and 360 to 540 days of age. Both parameters were also calculated over the pre- and post-weaning periods (1 to 180 days of age and 180 to 540 days of age).

### **Blood sampling and biochemical markers assays in foals**

Jugular vein blood samples were collected into dry tubes between 9:00 and 10:00 AM at 3 days of age after 4 hours fasting, at 140 days of age after 6 hours fasting and at 180 and 360 days of age after overnight fasting. After centrifugation at 3,500 g for 10 minutes, serum was separated and stored at -20°C until assay.

Serum concentrations of osteocalcin were measured in singleton with a commercial ELISA kit (AC-11F1, Immunodiagnostic Systems, Paris, France) validated for use in the horse in the Frank Duncombe Departmental Laboratory (<http://www.labo-frank-duncombe.fr/>). Photometric measurement was set at a wavelength of 450 nm. The minimum level of detection was 0.5 ng/mL. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 4.0% and 1.8%, respectively.

Serum bone specific alkaline phosphatase (b-AIP) concentrations were determined using the Hydrasys SEBIA's semi-automated agarose gel electrophoresis system (Hydragel 7 & 15 ISO-PAL, SEBIA) as recommended by the International Federation of Clinical Chemistry (<http://www.ifcc.org>) (Schumann et al., 2011).

Serum concentrations of CTX-II were measured in singleton with a commercial ELISA kit (AC-08F1, Immunodiagnostic Systems, Paris, France) validated for use in the horse in the Frank Duncombe Departmental Laboratory. Photometric measurement was set at a wavelength of 450 nm. The minimum level of detection was 3.7 pg/mL. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 4.8 and 2.4%, respectively.

Serum concentrations of hydroxyproline were measured in singleton with a colorimetric assay adapted by the Frank Duncombe Departmental Laboratory (Jaeschke, 1975; Valette et al., 2007). Hydroxyproline is extracted from serum with perchloric acid and oxidized by chloramide-T. A red compound was then formed with p-dimethylaminobenzaldehyde. Photometric measurement was set at a wavelength of 558 nm. The minimum level of detection was 0.25 mg/L.

### **Radiographic examination**

Radiographic examinations at 200 and 540 days of age were performed with a mobile computed radiography system, associated with an x-ray generator Gierrth RHF 200 ML. The Vetray CR2430 scanning system was used to develop fluorescent phosphor plates and the numeric images were treated and viewed with Vetray Vision analyzing software V.4.4.4 (VetRay GmbH, Pfaffenhofen, Germany). Foals were sedated using romifidine (Sedivet, Boehringer Ingelheim, Belgium, 0.06 mg/kg intravenous) alone or combined with butorphanol (Dolorex, IntervetSchering Plough Belgium, 0.020 mg/kg intravenous) when needed. Eleven successive views were obtained according to a standardized protocol previously reported (van der Heyden et al., 2013). Two experimented examiners analyzed separately the digital radiographs, using the method of radiographic interpretation previously described (Denoix, 1990). Foals were classified as OC-positive according to the presence of

one or more OC lesions identified by both examiners. OC was diagnosed according to the presence of lesions as previously described (van Weeren, 2006; van der Heyden et al., 2013).

### **Statistical analysis**

Results are presented throughout as median curves with interquartile range or boxplots (minimum-maximum). Statistical analyses were carried out using R software ([www.r-project.org/](http://www.r-project.org/), version 3.6.2).

Repeated data from body measurements and from biomarkers assays were analyzed according to two age periods: the pre-weaning stage (from 1 to 180 days of age) and the post-weaning stage (from 180 to 540 days of age). Breed-specificities were first analyzed (P-P vs S-S). Subsequently, the effects of the transfer of pony embryos (P-P vs P-D) and the effects of the transfer of saddlebred embryos (S-S vs S-P and S-D) were tested. Repeated data were analyzed in each period using the F1 LD F1 model of the nparLD function for all analyses, followed by paired comparison to compare saddlebred groups (Noguchi et al., 2012). If a significant group effect was found ( $p$ -value < 0.05), data were analyzed at each time point using the Mann-Whitney or the Kruskal-Wallis test followed by the NDWD *post hoc* test, as appropriate. All  $p$ -values were adjusted using the FDR (Benjamini-Hochberg) method.

Relative risks, odds ratios and associated 95% confidence intervals (CI) related to the presence or lack of OC lesions were calculated using the MedCalc software (<http://www.medcalc.org/>, v13.3.3). Significance levels were determined using the chi-squared test.

$P$  value < 0.05 was considered significant whereas  $p$ -value > 0.05 and < 0.1 was considered as a tendency. Significant  $p$ -values or tendencies indicated by the F1 LD F1 test are shown in the text. Adjusted *post-hoc*  $p$ -values are notified in graphs.

## RESULTS

### Breed-specific effects (P-P vs S-S)

Body measurements in S-S and P-P foals are shown in Figure 2A and Figure 3. All body measurements increased significantly with time throughout each period in both control groups ( $p < 0.001$  for all measurements in both periods). All body measurements were subject to a significant breed effect in both periods ( $p < 0.001$  for all measurements in both periods, but  $p = 0.001$  for shoulder width and  $p = 0.016$  for hip width in the pre-weaning period). S-S foals were significantly heavier and had significantly higher withers' height, front leg length, chest circumference and cannon bone width than P-P foals at each time point. S-S foals also had a significantly higher shoulder and hip width than P-P foals at most time points, but had similar shoulder width as P-P foals at 30 days of age (tendency,  $p = 0.094$ ) and similar hip width as P-P foals at 30, 60 and 90 (tendency,  $p = 0.074$ ) days of age. Weight and height gains were significantly higher in S-S compared to P-P foals in both the pre- and post-weaning periods (Figure 9).

Serum biomarkers concentrations in S-S and P-P foals are shown in Figure 4. All biomarkers concentrations decreased significantly with time throughout each time period in both control groups ( $p < 0.001$  for all biomarkers in both periods, except that  $p = 0.0067$  for osteocalcin concentrations in the post-weaning period). No breed effect was found for osteocalcin concentrations at any time. CTX-II and b-AIP concentrations, however, differed significantly between breeds for each period ( $p < 0.001$  for CTX-II in both periods;  $p = 0.025$  and  $p = 0.006$  for b-AIP in the pre- and post-weaning periods). *Post hoc* analysis indicated that S-S foals had higher b-AIP concentrations than P-P foals at 180 days (tendency,  $p = 0.057$ ),

significantly higher CTX-II concentrations than P-P foals at 180 days of age and higher CTX-II concentrations at 360 days of age. Hydroxyproline concentrations differed significantly between breeds only in the post-weaning period ( $p < 0.001$ ). S-S foals had significantly higher hydroxyproline concentrations than P-P foals at 360 days of age.

The incidence of OC is shown in Figure 10. Associated relative risks and odds ratios are presented in Table 2. In the 11 P-P foals, one colt presented one OC lesion in the right front fetlock joint at 200 days of age that had disappeared at 540 days of age. Within the 21 S-S foals, six foals had up to two OC lesions in the stifle, hock or hind fetlock joint at 6-8 months, which were not present any more at 540 days of age. Two other foals had up to three OC lesions in the hock or hind fetlock joints, only at 540 days of age. The relative risk and odd ratios for developing OC, however, were not significant in S-S compared to P-P foals, neither at 200 nor at 540 days of age.

#### **Effects of embryo transfer into a draft mare for pony foals (P-P vs P-D)**

Body measurements of P-P and P-D foals are shown in Figure 2b and Figure 5. Cannon bone width was measured in all pony foals (both P-P and P-D groups) only at 360 and 540 days of age, hence some comparisons could not be made before this age. At birth, body weight and withers' heights were significantly increased by 60.6% and 15.7%, respectively, in P-D compared to P-P foals. All body measurements increased significantly with time throughout each period in both P-P and P-D groups ( $p < 0.001$  for all measurements in both periods). All body measurements were subject to a significant group effect in each period ( $p < 0.001$  for all measurements in both periods, but  $p = 0.016$  for shoulder width and  $p = 0.011$  for hip width in the pre-weaning period and  $p = 0.017$  for shoulder width and  $p = 0.008$

for hip width in the post-weaning period). P-D foals were significantly heavier and had significantly increased withers' height, front leg length and chest circumference compared to P-P controls, but shoulder width was not different between groups at any time. The hip width of P-D foals was also significantly increased compared to P-P controls at 1, 180, 360 and 540 days of age. Similar tendencies were observed for hip width at 120 ( $p=0.094$ ), 150 ( $p=0.086$ ) and 270 ( $p=0.086$ ) days of age. The width of the cannon bone was increased in P-D foals compared to P-P controls at 360 and 540 days of age. At the end of the monitoring period, body weight and withers' height were still significantly increased by 30.4% and 8.5% in P-D compared to P-P foals. Weight gain was increased in P-D foals compared to P-P controls in the pre-weaning period, whereas no difference was found between both groups in terms of height gain (Figure 9).

Serum biomarkers concentrations for P-P and P-D foals are shown in Figure 6. All biomarkers concentrations decreased significantly with time throughout each period ( $p<0.001$  for all biomarkers in both time periods), but for osteocalcin in the post-weaning period in the P-D group, where osteocalcin concentrations increased between 180 and 360 days of age. Osteocalcin, b-AIP and hydroxyproline concentrations were subject to a significant group effect in the pre-weaning period ( $p=0.005$ ,  $p=0.059$  and  $p=0.004$ , respectively). P-D foals had significantly lower osteocalcin and hydroxyproline concentrations than P-P controls at 140 days of age. P-D foals tended to have lower osteocalcin concentrations at 180 days of age (tendency,  $p=0.075$ ) and decreased b-AIP concentrations at 3 and 140 days of age (tendencies,  $p=0.075$  and  $p=0.092$ , respectively) compared to P-P foals.

The incidence of OC in P-D and P-P foals is shown in Figure 10. Associated relative risks and odds ratios are presented in Table 2. From the 6 P-D foals, one presented an OC

lesion in the right stifle joint at 200 days of age that had disappeared at 540 days of age. One other foal had an OC lesion in the right hind fetlock joint at 200 days of age that was still observed at 540 days of age. The relative risks and odd ratios for developing OC, however, were not significant in P-D compared to P-P foals, neither at 200 nor at 540 days of age.

### **Effects of between-breed embryo transfer in saddlebred foals (S-S vs S-P vs S-D)**

Body measurements of S-P, S-S and S-D foals are shown in Figure 2C and Figure 7. Cannon bone width was not measured in S-D foals before 270 days of age, hence some comparisons could not be made before this age. At birth, body weight and withers' height were significantly decreased by 42.3% and 12.4% in S-P compared to S-D foals. All body measurements increased significantly with time throughout each period in the S-P, S-S and S-D groups ( $p < 0.001$  for all measurements in both periods). All body measurements were subject to a significant group effect in the pre-weaning period ( $p < 0.001$  for all measurements, except that  $p = 0.003$  for shoulder width and  $p = 0.019$  for hip width). There was a significant group effect only for withers' height, front leg length and chest circumference in the post-weaning period ( $p < 0.001$  for the three measurements), and a tendency was observed for body weight ( $p = 0.069$ ). S-P foals had similar bodyweight, withers' height, shoulder and hip width than S-S controls at each time point. S-P foals, however, had significantly shorter front legs compared to S-S controls at 270, 360 and 540 days of age, a significantly decreased chest circumference than S-S controls at 540 days of age, as well as significantly decreased cannon bone width than S-S controls at each time point (but for a tendency at 270 days of age;  $p = 0.053$ ). S-P foals were significantly lighter, with a significantly shorter withers' height and smaller chest circumference than S-D foals at each time point, except at 270 days of age where they were similar. The front legs of S-P foals were also significantly shorter compared



to S-D foals at each time point, with a tendency at 270 days of age ( $p=0.054$ ). Shoulder and hip width were significantly decreased in S-P compared to S-D foals from 1 to 180 days of age and were similar thereafter. The cannon bone was significantly thinner in S-P than S-D foals at 270, 360 and 540 days of age.

In contrast, no difference was found for the comparison of body measurements of S-D foals and S-S controls. At the end of the monitoring period, body weight and withers' height were still significantly decreased by 16.9% and 4.6% in S-P compared to S-D foals. Weight gains were significantly less, whereas height gains were significantly larger in S-P compared to S-D foals in the pre-weaning period. No more difference was found thereafter (Figure 9).

The concentrations of biomarkers in S-P, S-S and S-D foals are shown in Figure 8. All biomarkers concentrations decreased significantly with time throughout each period in the S-P, S-S and S-D groups ( $p<0.001$  for all biomarkers in both periods, except that  $p=0.009$  for osteocalcin concentrations in the post-weaning period). No significant group effect was found. Osteocalcin concentrations, however, were significantly lower in both S-P and S-D foals compared to S-S controls at 3 days of age, as well as significantly lower in S-D foals compared to S-P foals at 180 days of age. Hydroxyproline concentrations were also significantly lower in S-D compared to S-S foals at 3 days of age.

The incidence of OC is shown in Figure 10 and associated relative risks and odds ratios are presented in Table 2. All of the 6 S-P foals presented up to two OC lesions in the stifles or fetlocks joints at 200 days of age. Only two of them (the two with two OC lesions at 200 days of age) were still OC-positive at 540 days of age. From the 8 S-D foals, one presented two OC lesions at 200 and 540 days of age (left hind fetlock and right hock joints), one had an OC lesion in the left front fetlock joint at 200 days of age only and one other foal

had an OC lesion in the right hind fetlock joint at 540 days of age that was not present before. The relative risk and odd ratio was significantly increased in S-P foals compared to S-S controls ( $p=0.0009$ ), as well as compared to S-D foals ( $p=0.0275$ ) at 200 days of age, but not at 540 days of age. No significant decrease in the relative risk or odd ratio was found in S-D compared to S-S foals, neither at 200 nor at 540 days of age.

## **DISCUSSION**

The period studied here is the period of rapid post-natal growth in foals. Ponies, saddlebreds and draft horses were chosen in the present model because of their difference in body size, as illustrated by the body measurements described above in pony and saddlebred control foals. Increased fetal growth was induced by the transfer of pony embryos into draft dams (+61% body weight and +16% withers' height at birth), confirming a previous report of fetal overgrowth in Pony-in-Thoroughbred foals (+58% body weight and +14% withers' height at birth) (Allen et al., 2002; Allen et al., 2004). Reduced body weight (-42%) and withers' height (-12%) at birth, indicating intra-uterine growth restriction (IUGR), was induced by the transfer of saddlebred embryos into pony dams. This confirms previous report of fetal growth retardation in Thoroughbred-in-Pony foals (-37% body weight and -12% withers' height at birth) (Allen et al., 2002; Allen et al., 2004). Such an interaction between maternal and fetal genotypes has also been described in cows and pigs (Ferrell, 1991; Biensen et al., 1999). Modulation of the fetal growth potential by the maternal environment is controlled by the placental morphology (mass, surface area and volume) and function as demonstrated by the increased development of the microcotyledons in the restricted placentas in Thoroughbred-in-Pony pregnancies (Allen et al., 2002).

In pony foals, increased fetal growth resulted in oversize throughout the 18-month period: all body measurements were largely and consistently amplified with the exception of shoulder width which remained unaffected. P-D foals therefore underwent an overall harmonious overgrowth. In contrast, the growth patterns in S-D foals were very close to those of S-S controls. Very few differences were found in body measurements between S-P and S-S foals, but for the cannon bone that was thinner throughout the 18-month period, as well as for the front leg that was shorter in the post-weaning period and for the chest circumference at 18 months of age in S-P foals. Restricted S-P foals were clearly different from S-D foals, being consistently lighter and smaller, with reduced chest circumference and narrower shoulder and hips in the pre-weaning period. Although post-natal growth was slower until weaning, S-P foals caught up with the other saddlebred horses as early as 9 months of age. This is consistent with previous reports of accelerated growth throughout the first months of life in IUGR infants (Hokken-Koelega et al., 1995; Karlberg and Albertsson-Wikland, 1995; Karlberg et al., 1997) or in lambs after restriction of placental implantation (De Blasio et al., 2007). All body measurements of S-P foals, however, were not uniformly affected, leading to disharmonious growth. Allen and colleagues also observed catch-up growth in Thoroughbred-in-Pony foals for body weight, height and girth, but IUGR foals still had shorter front legs and thinner cannon bones at 3 years of age (Allen et al., 2004). This raises the question of joint health as comparatively short legs and narrow cannon bones could alter the load distribution across the equine locomotory system and increase the pressure on the joint, inducing predisposition to orthopedic problems (Stock and Distl, 2006). Shorter and thinner bones, decreased biomechanical strength of bones and increased risk fracture have already been related to slowed-down intra-uterine growth and in the first year after birth in humans (Javaid et al., 2006; Oliver et al., 2007; Dennison et al., 2013). Indeed, post-natal growth of the foal is not only a result of antenatal growth, but is also dependent on post-natal nutrition, in

particular milk supply from the mare, at least for the first two to three months after birth. Milk yield increases with breed size and therefore is higher in draft compared to saddlebred and pony mares (Doreau and Boulot, 1989b, a). This could explain the enhanced pre-weaning growth in P-D foals and the slowed-down pre-weaning growth in S-P compared to S-D foals. Differences between milk supply between pony and draft mares were probably too large to be compensated by previously hypothesized adaptations to the foal's demand (Cymbaluk et al., 1993).

Enchondral ossification is a complex mechanism which is associated with growth. This phenomenon occurs in the cartilage growth plate and is responsible for the longitudinal bone growth on either side of the primary ossification center, under the control of endocrine factors. Among these, Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) and thyroid hormones (thyroxin  $T_4$  and triiodothyronine  $T_3$ ) concentrations were previously investigated in the present model of between-breed embryo transfer (Peugnet et al., 2014) (and Peugnet et al., in preparation). Here, factors directly related to bone metabolism and function were investigated. Osteocalcin is released by osteoblasts (Price et al., 1981; Camarda et al., 1987). It is a sensitive marker of osteoblastic activity and bone formation in pathology in humans (Delmas et al., 1983), sheep (Pastoureau et al., 1991) and horses (Billingham et al., 2004; Donabedian et al., 2008) and correlates with growth rate in numerous species including horses (Lepage et al., 1990). Osteocalcin release by osteoblasts is stimulated by IGF-I (Chenu et al., 1990) and  $T_3$  (Gouveia et al., 2001). Although breed-specificities were previously demonstrated for osteocalcin concentrations between Thoroughbred, French Trotters and Selle Français (Valette et al., 2007), no significant difference was observed here between ponies and saddlebreds.

Here, P-D foals had both decreased osteocalcin and  $T_3$  blood concentrations until weaning, whereas S-P foals had both increased osteocalcin and  $T_3$  blood concentrations at weaning (Peugnet et al., 2014). Decreased osteocalcin together with increased  $T_3$  concentrations in S-P foals at 3 days of age, however, seem to oppose the previous observation, although these data are consistent with observations in sheep where osteocalcin concentrations in lambs born with low birth weight are also reduced at birth (Pastoureau et al., 1991). Moreover, the lower osteocalcin concentrations at 3 days of age and the increased fasting glucose from 1 to 18 months of age in the IUGR S-P foals (Peugnet et al., 2014) (and Peugnet et al., in preparation) are consistent with the elevated glycemia observed in osteocalcin knockout mice (Lee et al., 2007). Comparisons between ponies and other experimental models, however, have to be performed with caution, because ponies are a model of innate insulin resistance (Rijnen and van der Kolk, 2003) and even such a dramatic increase of fetal growth was not able to durably affect insulin sensitivity (Peugnet et al., 2014) (and Peugnet et al., in preparation). Bone alkaline phosphatase (b-AIP) concentrations are known to correlate with growth and to parallel osteocalcin patterns of secretion in horses (Lepage et al., 1991) but to vary between breeds after one year of age (Valette et al., 2007). b-AIP is considered a marker of chondrocytes differentiation and its biological activity is stimulated by  $T_4$  and  $T_3$  (Smeets and van Buul-Offers, 1986; Ohlsson et al., 1992) and inhibited by IGF-I (Magnusson et al., 1997). Here, S-S foals had higher b-AIP together with reduced  $T_3$  concentrations compared to P-P foals at weaning. The lower b-AIP at weaning may be related to the reduction in plasma IGF-I at this time (Peugnet et al., 2014). In experimentally overgrown foals, the decreased b-AIP concentrations in P-D foals, concomitantly with decreased  $T_4$  and  $T_3$  concentrations before weaning, make sense.

Both osteocalcin and b-AIP were used as markers of bone anabolic processes. CTX-II and hydroxyproline were then chosen as markers of catabolic processes. Hydroxyproline accounts for 13% of the amino-acids in collagen molecules and most of the hydroxyproline released in the circulation comes from the degradation of bone matrix in growing horses (Jaeschke, 1975). As for osteocalcin and b-AIP, serum hydroxyproline concentrations decrease with age in growing horses (Yamamoto, 1981; van den Boom et al., 2004) and when the severity of osteoarthritis lesions increases (van den Boom et al., 2004). Osteocalcin knockout mice have a deficiency in bone resorption and it could be expected that the plasma concentrations of hydroxyproline would be reduced (Ducy et al., 1996). In the present work, both P-D and S-D foals had decreased hydroxyproline measurements compared to their respective controls, respectively at 140 and 3 days of age, which may be related to the reduced osteocalcin concentrations in both groups at the same ages. Differences in hydroxyproline concentrations have been previously reported between three light breeds in the first few days after birth (Valette et al., 2007), but this is the first observation of increased hydroxyproline levels in saddlebred horses compared to ponies at one year of age.

CTX-II is released during the degradation of the major component of the cartilage extracellular matrix *i.e.*, type II collagen, which is synthesized by chondrocytes. Type II collagen is essential for cartilage tissue tensile strength and stiffness (Mayne, 1989; Kuettner, 1992) and CTX-II is a good marker of the severity and evolution of cartilage degradation in humans (Garnero et al., 2008). Synovial fluid concentrations of CTX-II are elevated in young horses at the end of growth (5 to 6 years old) then decrease in horses aged 7 to 13 years and increase again in older horses (14 to 23 years old) (Fyfe, 2012). The present study highlights a decrease of serum CTX-II concentrations throughout the first 18 months after birth in the five groups. Only an effect of the breed was found on serum CTX-II levels, with saddlebreds having higher levels than ponies from weaning, which was not reported before.

Enchondral ossification occurs in the epiphyseal cartilage as well, between the secondary ossification centers and the articular cartilage and provides the shape of the ends of long bones. Endocrine control in this region of long bones is the same as in growth plates. OC lesions in horses have been hypothesized to originate from a local defect of enchondral ossification in the epiphyseal cartilage which chondrocytes fail to undergo normal differentiation and/or maturation (Jeffcott and Henson, 1998; Ytrehus et al., 2007; Lecocq et al., 2008). That some bone characteristics and skeletal pathologies have a fetal origin is expected based on studies of human cohorts (Cooper et al., 1997; Dennison et al., 2005) and indeed, in the present work, the most noteworthy result in terms of OC lesions came from the restricted S-P group. All S-P foals were affected at 200 days of age. Most lesions disappeared thereafter and the relative risk was not significantly increased anymore at 540 days of age. All four biochemical markers studied here were previously related to joint lesions, including OC lesions, or to lameness. Only osteocalcin and CTX-II were precisely related to OC lesions presence, number and/or severity (Valette et al., 2007; Fyfe, 2012). In Dutch Warmblood foals, synovial fluid osteocalcin concentration was shown to correlate with the presence of OC positively at 5 months of age and negatively at 11 months of age (Billinghurst et al., 2004). In Selle Français foals, serum osteocalcin concentration at 2 weeks of age correlates with OC lesions number at 5.5 months of age and to a *postmortem* score of OC based on histological examination at 11 months of age (Donabedian et al., 2008). Synovial fluid CTX-II concentration also increases in presence of OC lesions (Trumble et al., 2009; Cleary et al., 2010) and correlates negatively with the lameness score in Thoroughbred horses (Fyfe, 2012). b-AIP activity is known to decrease in hypertrophic chondrocytes near OC lesions in pigs (Ekman and Rodriguez-Martinez, 1991).

Here, there were no correlations between the presence of OC and biochemical markers in serum, probably because of the low number of foals in each group. We observed an

increased (but non-significantly) incidence of OC in saddlebred foals, which is consistent with the low number of papers reporting OC in ponies. Indeed, to our knowledge, only one paper reported OC in four pony foals (Voute et al., 2011), whereas its prevalence can rise up to 44% in some populations of saddlebred horses (van der Heyden et al., 2008). Since insulin inhibits chondrocytes maturation, the low incidence of OC in ponies may be related to the low insulin sensitivity previously demonstrated in this breed (Rijnen and van der Kolk, 2003; Peugnet et al., 2014) (and Peugnet et al., in preparation). On the opposite, the higher incidence of OC in S-P foals at 200 days of age is consistent with previously report of enhanced insulin sensitivity at this age and hyperglycemia up to 18 months of age (Peugnet et al., 2014). Further investigations of insulin sensitivity in S-P foals showed that they returned to normal values of sensitivity at 18 months of age (Peugnet et al., in preparation). This could partly explain the resorption of most primary lesions observed at 200 days of age. Whether our foals underwent different postprandial responses remains to be determined. The importance of these data regarding OC must therefore be interpreted with caution and calls for further work in this area, given the fact that osteoarticular status of mares and stallions are unknown.

In summary, the present study demonstrates that modifications of fetal growth in equids through the transfer of embryos of large or small breeds into recipient mares of large or small breed mares alters durably the post-natal growth, with some catch-up growth in case of intra-uterine restriction. Body conformation is affected in both IUGR and overgrown groups and this induces effects on skeletal development. Impacts of early life events on bone and cartilage turnover seem to be transient as effects were mainly seen shortly after weaning but not thereafter. These data bear importance in particular for embryo transfer practice. For example, when a limited withers' height is required for registration in the stud-book, equine breeders have to select recipient mares which conformation approaches that of biological



dams. Paying attention to the recipients' conformation could also be of interest in an attempt to reduce bony pathologies incidence amongst equine populations. Further investigations are needed to further explore what prenatal and post-natal maternal influences are most relevant for post-natal skeletal development in foals.

## **LITERATURE CITED**

- Allen, W. R., S. Wilsher, C. Tiplady, and R. M. Butterfield. 2004. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction* 127: 67-77.
- Allen, W. R. et al. 2002. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* 123: 445-453.
- Barker, D. J. 1990. The fetal and infant origins of adult disease. *Bmj* 301: 1111.
- Barker, D. J. et al. 1993a. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341: 938-941.
- Barker, D. J. et al. 1993b. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62-67.
- Barker, D. J., and C. Osmond. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1: 1077-1081.
- Barker, D. J., P. D. Winter, C. Osmond, B. Margetts, and S. J. Simmonds. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2: 577-580.
- Biensen, N. J., M. E. Wilson, and S. P. Ford. 1999. The impacts of uterine environment and fetal genotype on conceptus size and placental vascularity during late gestation in pigs. *Journal of animal science* 77: 954-959.

- Billingham, R. C., P. A. Brama, P. R. van Weeren, M. S. Knowlton, and C. W. McIlwraith. 2004. Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals. *American journal of veterinary research* 65: 143-150.
- Camarda, A. J., W. T. Butler, R. D. Finkelman, and A. Nanci. 1987. Immunocytochemical localization of gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentin. *Calcified tissue international* 40: 349-355.
- Carlson, C. S., L. D. Cullins, and D. J. Meuten. 1995. Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply. *Veterinary pathology* 32: 641-647.
- Carlsten, J., B. Sandgren, and G. Dalin. 1993. Development of osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of Standardbred trotters. I. A radiological survey. *Equine veterinary journal supplement* 25: 42(47).
- Chenu, C. et al. 1990. Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone* 11: 81-86.
- Cleary, O. B., T. N. Trumble, K. A. Merritt, and M. P. Brown. 2010. Effect of exercise and osteochondral injury on synovial fluid and serum concentrations of carboxy-terminal telopeptide fragments of type II collagen in racehorses. *American journal of veterinary research* 71: 33-40.
- Cooper, C. et al. 1997. Growth in infancy and bone mass in later life. *Annals of the rheumatic diseases* 56: 17-21.
- Cymbaluk, N. F., M. E. Smart, F. M. Bristol, and V. A. Pouteaux. 1993. Importance of milk replacer intake and composition in rearing orphan foals. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 34: 479-486.

- De Blasio, M. J., K. L. Gatford, J. S. Robinson, and J. A. Owens. 2007. Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292: R875-886.
- Delmas, P. D., H. W. Wahner, K. G. Mann, and B. L. Riggs. 1983. Assessment of bone turnover in postmenopausal osteoporosis by measurement of serum bone Gla-protein. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 102: 470-476.
- Dennison, E., Z. Cole, and C. Cooper. 2005. Diagnosis and epidemiology of osteoporosis. *Current opinion in rheumatology* 17: 456-461.
- Dennison, E. M., N. C. Harvey, and C. Cooper. 2013. Programming of osteoporosis and impact on osteoporosis risk. *Clinical obstetrics and gynecology* 56: 549-555.
- Denoix, J. M. 1990. Sémiologie radiographique générale des articulations. *Pratique Vétérinaire Equine* 22: 14-27.
- Donabedian, M. et al. 2008. Early changes in biomarkers of skeletal metabolism and their association to the occurrence of osteochondrosis (OC) in the horse. *Equine veterinary journal* 40: 253-259.
- Doreau, M., and S. Boulot. 1989a. Methods of measurement of milk yield and composition in nursing mares: a review. *Lait* 69: 159-171.
- Doreau, M., and S. Boulot. 1989b. Recent knowledge on mare milk production: a review. *Livestock production science* 22: 213-235.
- Ducy, P. et al. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448-452.
- Ekman, S., and H. Rodriguez-Martinez. 1991. Ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the normal and osteochondrotic joint cartilage of growing pigs. *Acta anatomica* 140: 26-33.

- Ferrell, C. L. 1991. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *Journal of animal science* 69: 1945-1953.
- Forhead, A. J., J. C. Ousey, W. R. Allen, and A. L. Fowden. 2004. Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *The Journal of endocrinology* 181: 459-467.
- Fyfe, E. V. 2012. Biomarker assessment for detection of joint pathology in horses and evaluation of the nutritional supplement Steadfast Equine as a therapeutic, University of Missouri-Columbia.
- Garnero, P. et al. 2008. Relationships between biochemical markers of bone and cartilage degradation with radiological progression in patients with knee osteoarthritis receiving risedronate: the Knee Osteoarthritis Structural Arthritis randomized clinical trial. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 16: 660-666.
- George, L. A., W. B. Staniar, K. H. Treiber, P. A. Harris, and R. J. Geor. 2009. Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. *Domestic animal endocrinology* 37: 23-29.
- Glade, M. J., and T. H. Belling, Jr. 1984. Growth plate cartilage metabolism, morphology and biochemical composition in over- and underfed horses. *Growth* 48: 473-482.
- Glade, M. J., and T. J. Reimers. 1985. Effects of dietary energy supply on serum thyroxine, tri-iodothyronine and insulin concentrations in young horses. *The Journal of endocrinology* 104: 93-98.
- Gouveia, C. H., J. J. Schultz, A. C. Bianco, and G. A. Brent. 2001. Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *The Journal of endocrinology* 170: 667-675.

- Henson, F. M. et al. 1997. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine veterinary journal* 29: 441-447.
- Hokken-Koelega, A. C. et al. 1995. Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatric research* 38: 267-271.
- Jaeschke, G. 1975. Routine determination of free hydroxyproline in horse serum methods and normal values. *Zentralblatt für Veterinarmedecin A* 22: 89-101.
- Javaid, M. K. et al. 2006. Infant growth influences proximal femoral geometry in adulthood. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21: 508-512.
- Jeffcott, L. B., and F. M. Henson. 1998. Studies on growth cartilage in the horse and their application to aetiopathogenesis of dyschondroplasia (Osteochondrosis). *Veterinary journal* 156: 177-192.
- Karlberg, J., and K. Albertsson-Wikland. 1995. Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatric research* 38: 733-739.
- Karlberg, J. P., K. Albertsson-Wikland, E. Y. Kwan, B. C. Lam, and L. C. Low. 1997. The timing of early postnatal catch-up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Hormone research* 48 Suppl 1: 17-24.
- Kuettner, K. E. 1992. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clinical biochemistry* 25: 155-163.
- Lecocq, M. et al. 2008. Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis? *Equine veterinary journal* 40: 442-454.
- Lee, N. K. et al. 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456-469.

- Lepage, O. M., L. DesCoteaux, M. Marcoux, and A. Tremblay. 1991. Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 55: 5-10.
- Lepage, O. M., M. Marcoux, and A. Tremblay. 1990. Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 54: 223-226.
- Magnusson, P., M. Degerblad, M. Saaf, L. Larsson, and M. Thoren. 1997. Different responses of bone alkaline phosphatase isoforms during recombinant insulin-like growth factor-I (IGF-I) and during growth hormone therapy in adults with growth hormone deficiency. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12: 210-220.
- Martin-Rosset, W. 2012. *Nutrition et alimentation des chevaux*. Quae, France.
- Mayne, R. 1989. Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis and rheumatism* 32: 241-246.
- Noguchi, K., Y. Gel, R. Brunner, and F. Konietzschke. 2012. nparLD: an R software package for non-parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *Journal of Statistical Software* 50: 1-23.
- Ohlsson, C., A. Nilsson, O. Isaksson, J. Bentham, and A. Lindahl. 1992. Effects of tri-iodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *The Journal of endocrinology* 135: 115-123.
- Oliver, H. et al. 2007. Growth in early life predicts bone strength in late adulthood: the Hertfordshire Cohort Study. *Bone* 41: 400-405.

- Olstad, K., B. Ytrehus, S. Ekman, C. S. Carlson, and N. I. Dolvik. 2007. Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25: 1094-1105.
- Ousey, J. C., A. L. Fowden, S. Wilsher, and W. R. Allen. 2008. The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foals. *Equine veterinary journal* 40: 673-679.
- Pagan, J. D., R. J. Geor, S. E. Caddel, P. B. Pryor, and K. E. Hoekstra. 2001. The relationship between glycemic response and the incidence of OCD in thoroughbred weanlings: a field study. In: *AAEP*. p 322-325.
- Pastoureau, P., P. J. Meunier, and P. D. Delmas. 1991. Serum osteocalcin (bone Gla-protein), an index of bone growth in lambs. Comparison with age-related histomorphometric changes. *Bone* 12: 143-149.
- Peugnet, P. et al. 2014. Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses. *PloS one* 9: e102044.
- Price, P. A., M. K. Williamson, and J. W. Lothringer. 1981. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *The Journal of biological chemistry* 256: 12760-12766.
- Ralston, S. L. 1996. Hyperglycemia/hyperinsulinemia after feeding a meal of grain to young horses with osteochondritis dissecans (OCD) lesions. *Pferdeheilkunde* 12: 320-322.
- Rejno, S., and B. Stromberg. 1978. Osteochondrosis in the horse. II. Pathology. *Acta radiologica. Supplementum* 358: 153-178.
- Rijnen, K. E., and J. H. van der Kolk. 2003. Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp

- techniques in horses and ponies. *American journal of veterinary research* 64: 1260-1264.
- Savage, C. J., R. N. McCarthy, and L. B. Jeffcott. 1993. Effects of dietary energy and protein on induction of dyschondroplasia in foals. *Equine veterinary journal supplement* 16: 74-79.
- Schumann, G. et al. 2011. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 9: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Scientific Division, Committee on Reference Systems of Enzymes (C-RSE) (1). *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 49: 1439-1446.
- Smeets, T., and S. van Buul-Offers. 1986. Influence of growth hormone and thyroxine on cell kinetics in the proximal tibial growth plate of Snell dwarf mice. *Cell and tissue kinetics* 19: 161-170.
- Stock, K. F., and O. Distl. 2006. Genetic correlations between conformation traits and radiographic findings in the limbs of German Warmblood riding horses. *Genetics Selection Evolution* 38: 657-671.
- Trumble, T. N., M. P. Brown, and K. A. Merritt. 2009. Decreased aggrecan (G1/G2) to CTX II ratios in synovial fluid of horses with osteochondral injury. In: 55th Annual meeting of the orthopaedic research society, Las Vegas, USA
- Valette, J. P., C. Robert, M. P. Toquet, J. M. Denoix, and G. Fortier. 2007. Evolution of some biochemical markers of growth in relation to osteoarticular status in young horses: results of a longitudinal study in three breeds. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 4: 23-29.



- van den Boom, R., P. A. Brama, G. H. Kiers, J. de Groot, and P. R. van Weeren. 2004. Assessment of the effects of age and joint disease on hydroxyproline and glycosaminoglycan concentrations in synovial fluid from the metacarpophalangeal joint of horses. *American journal of veterinary research* 65: 296-302.
- van der Heyden, L. et al. 2013. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *The Veterinary record* 172: 68.
- van der Heyden, L., D. Serteyn, I. Caudron, D. Verwilhen, and J. P. Lejeune. 2008. Prévalence de l'ostéochondrose chez le cheval de sport de Wallonie. *Annales de médecine vétérinaire* 152: 131-137.
- van Weeren, P. R. 2006. Aetiology, diagnosis and treatment of OC(D). *Clinical Techniques in Equine Practice* 5: 248-258.
- Voute, L. C., F. M. Henson, D. Platt, and L. B. Jeffcott. 2011. Osteochondrosis lesions of the lateral trochlear ridge of the distal femur in four ponies. *The Veterinary record* 168: 265.
- Yamamoto, T. 1981. Diagnostic value of free hydroxyproline in horse serum. *Bulletin Of Equine Research Institute*: 3-83.
- Ytrehus, B., C. S. Carlson, and S. Ekman. 2007. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. *Veterinary pathology* 44: 429-448.

## **FIGURES**

**FIGURE 1.** Establishment of control and experimental pregnancies.

**FIGURE 2.** Foals' body weights from birth to 18 months of age in the five groups. A: control groups, P-P vs S-S; B: pony groups, P-P vs P-D; C: saddlebred groups, S-P vs S-S vs S-D.

Curves are presented as medians and interquartile ranges. Median values under the asterisks differ significantly between both groups in graphs A and B and between S-P and S-D groups in graph C (F1 LD F1 followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, adjusted  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 3.** Foals' body measurements from birth to 18 months of age in P-P and S-S control groups. A: withers' height; B: chest circumference; C: front leg length; D: shoulder width; E: hip width; F: cannon bone width. Curves are presented as medians and interquartile ranges. Median values under the asterisks differ significantly between both groups (F1 LD F1 followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, adjusted  $p < 0.05$ ) and median values under letters T tend to differ between both groups ( $0.05 < \text{adjusted } p < 0.1$ ).

**FIGURE 4.** Foals' biochemical markers at 3, 140, 180 and 360 days of age in P-P and s-S control groups. A: osteocalcin; B: bone-specific alkaline phosphatase; C: CTX-II; D: hydroxyproline. Scale on the y-axis is logarithmic. Asterisks indicate significant differences between both groups (F1 LD F1 followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, adjusted  $p < 0.05$ ) and letter T indicate tendencies to differ between both groups ( $0.05 < \text{adjusted } p < 0.1$ ).

**FIGURE 5.** Foals' body measurements from birth to 18 months of age in both pony groups. A: withers' height; B: chest circumference; C: front leg length; D: shoulder width; E: hip width; F: cannon bone width. Curves are presented as medians and interquartile ranges. Median values under the asterisks differ significantly between both groups (F1 LD F1 followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, adjusted  $p < 0.05$ ) and those under letters T tend to differ between both groups ( $0.05 < \text{adjusted } p < 0.1$ ).

**FIGURE 6.** Foals' biochemical markers at 3, 140, 180 and 360 days of age in both pony groups. A: osteocalcin; B: bone-specific alkaline phosphatase; C: CTX-II; D: hydroxyproline. Scale on the y-axis is logarithmic. Asterisks indicate significant differences between both groups (F1 LD F1 followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, adjusted  $p < 0.05$ ) and letter T indicate tendencies to differ between both groups ( $0.05 < \text{adjusted } p < 0.1$ ).

**FIGURE 7.** Foals' body measurements from birth to 18 months of age in the three saddlebred groups. A: withers' height; B: chest circumference; C: front leg length; D: shoulder width; E: hip width; F: cannon bone width. Curves are presented as medians and interquartile ranges. Median values under the asterisks differ significantly between S-P and S-D groups, those under the sharps differ significantly between S-P and S-S groups (F1 LD F1 followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, adjusted  $p < 0.05$ ) and those under letters T tend to differ between S-P and either S-D or S-S groups ( $0.05 < \text{adjusted } p < 0.1$ ).

**FIGURE 8.** Foals' biochemical markers at 3, 140, 180 and 360 days of age in the three saddlebred groups. A: osteocalcin; B: bone-specific alkaline phosphatase; C: CTX-II; D: hydroxyproline. Scale on the y-axis is logarithmic. Asterisks indicate significant differences between groups (F1 LD F1 followed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, adjusted  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 9.** Daily gains in body weight (A) and withers' height (B) in foals of the five groups.

**FIGURE 10.** Incidence of osteochondrosis in foals of the five groups.

**TABLE 1.** Distribution of mares between the five groups according to age, parity and withers' height (median [minimum-maximum]) and number of foals obtained each year with sex ratio within each group.

	<b>P-P</b>	<b>P-D</b>	<b>S-P</b>	<b>S-S</b>	<b>S-D</b>
<b>Mares' breed</b>	Pony	Draft	Pony	Saddlebred	Draft
<b>Withers' height (cm)</b>	121 [117-129]	158 [149-171]	133 [123-139]	160 [152-170]	158 [149-161]
<b>Age (years)</b>	9 [3-13]	5 [3-6]	9 [3-10]	7 [4-19]	4 [3-6]
<b>Parity</b>	1 [1-4]	1 [1-3]	1 [1-2]	2 [1-10]	1 [1-2]
<b>Foals' breed</b>	Pony	Pony	Saddlebred	Saddlebred	Saddlebred
<b>Number of foals in 2011</b>	5	5	2	13	8
<b>Number of foals in 2012</b>	6	1	4	8	0
<b>Total number of foals</b>	11	6	6	21	8
<b>Number of females</b>	6	4	2	13	6
<b>Number of males</b>	5	2	4	8	2

**TABLE 2.** Foals' relative risk and odds ratio of osteochondrosis in the five groups at 200 and 540 days of age.

Pair of groups compared	Age	Relative risk and odds ratio	Z-statistic	Significance level	
<i>S-S versus P-P</i>	200 days	Relative risk	3.1429	1.129	p = 0.2587
		95% CI	0.4307-22.9316		
		Odd's ratio	4.0000	1.201	p = 0.2299
	540 days	Relative risk	2.7273	0.666	p = 0.5056
		95% CI	0.1422-52.3069	0.679	p = 0.4973
		Odd's ratio	2.9487		
<i>P-D versus P-P</i>	200 days	Relative risk	3.6667	1.166	p = 0.2438
		95% CI	0.4125-32.5891	1.183	p = 0.2367
		Odd's ratio	5.0000		
	540 days	Relative risk	5.1429	1.048	p = 0.2945
		95% CI	0.2407-109.8950	1.072	p = 0.2838
		Odd's ratio	6.2727		
<i>S-P versus S-S</i>	200 days	Relative risk	3.1429	3.314	p = 0.0009*
		95% CI	1.5967-6.1863	2.230	p = 0.0258*
		Odd's ratio	31.0000		
	540 days	Relative risk	3.5000	1.413	p = 0.1576
		95% CI	0.6159-19.8880	1.365	p = 0.1722
		Odd's ratio	4.7500		
<i>S-D versus S-S</i>	200 days	Relative risk	0.8750	0.190	p = 0.8493
		95% CI	0.2206-3.4699	0.192	p = 0.8476
		Odd's ratio	0.8333		
	540 days	Relative risk	2.6250	1.061	p = 0.2887
		95% CI	0.4414-15.6099	1.044	p = 0.2965
		Odd's ratio	3.1667		
<i>S-P versus S-D</i>	200 days	Relative risk	3.3429	2.204	p = 0.0275*
		95% CI	1.1428	2.139	p = 0.0324*
		Odd's ratio	33.8000		
	540 days	Relative risk	1.3333	0.342	p = 0.7325
		95% CI	0.2562-6.9398	0.341	p = 0.7334
		Odd's ratio	1.5000		
		95% CI	0.1455-15.4612		

**FIGURE 1**

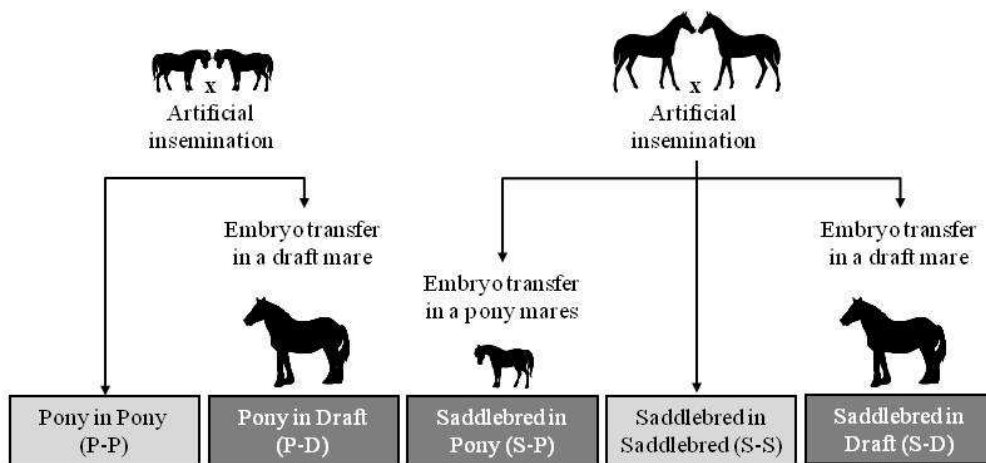
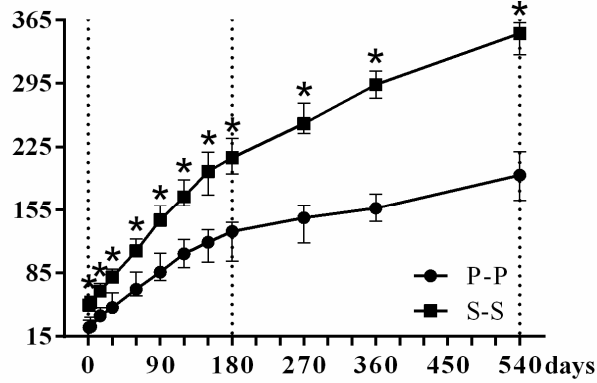
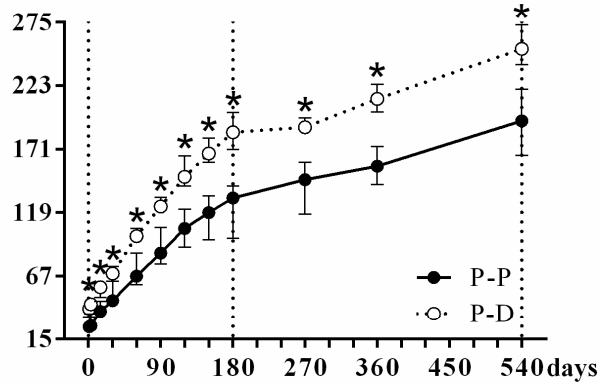


FIGURE 2

A. Body weight (kg) in controls



B. Body weight (kg) in ponies



C. Body weight (kg) in saddlebreds

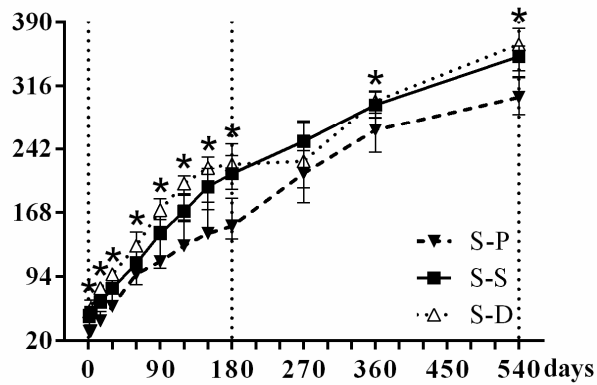


FIGURE 3

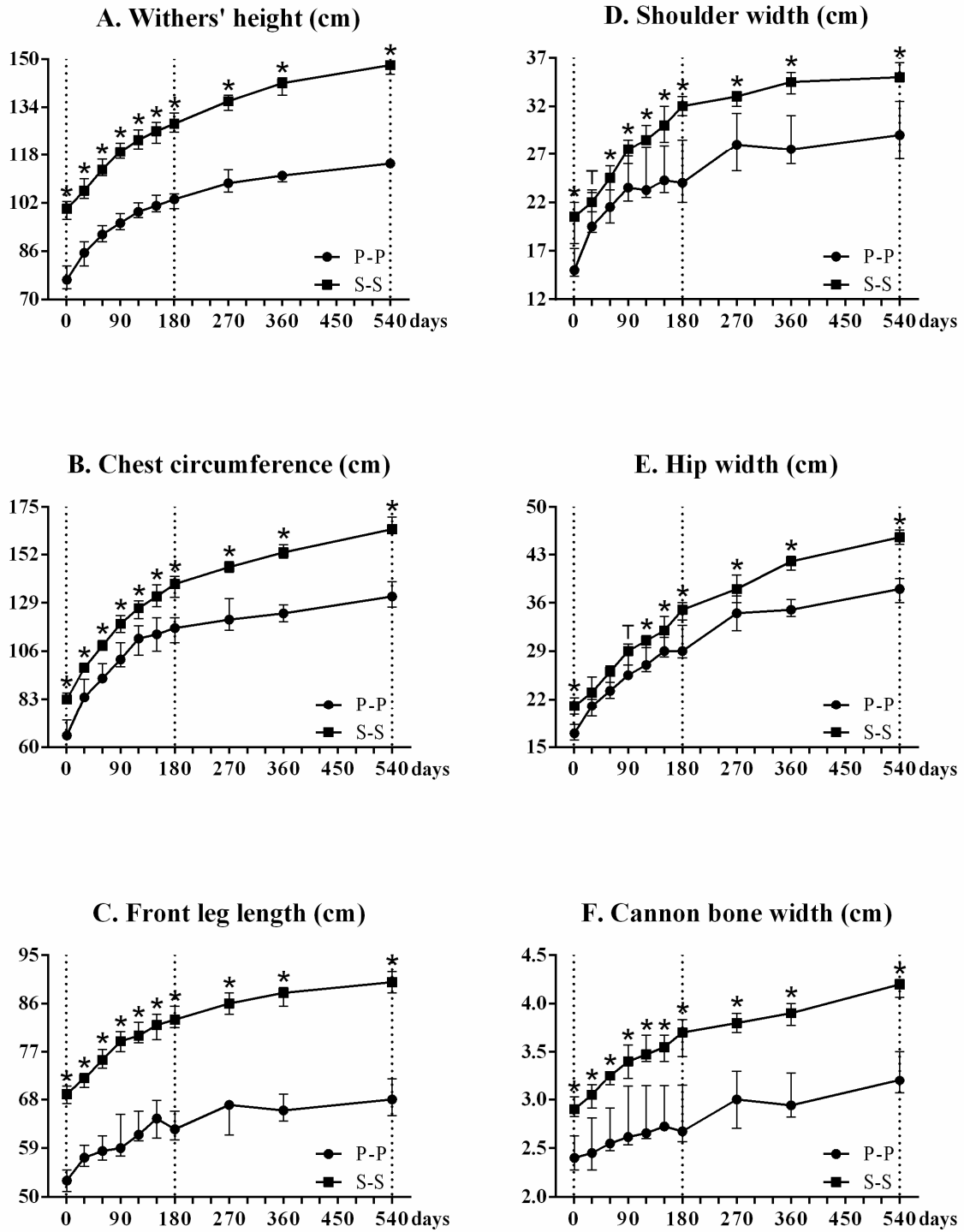
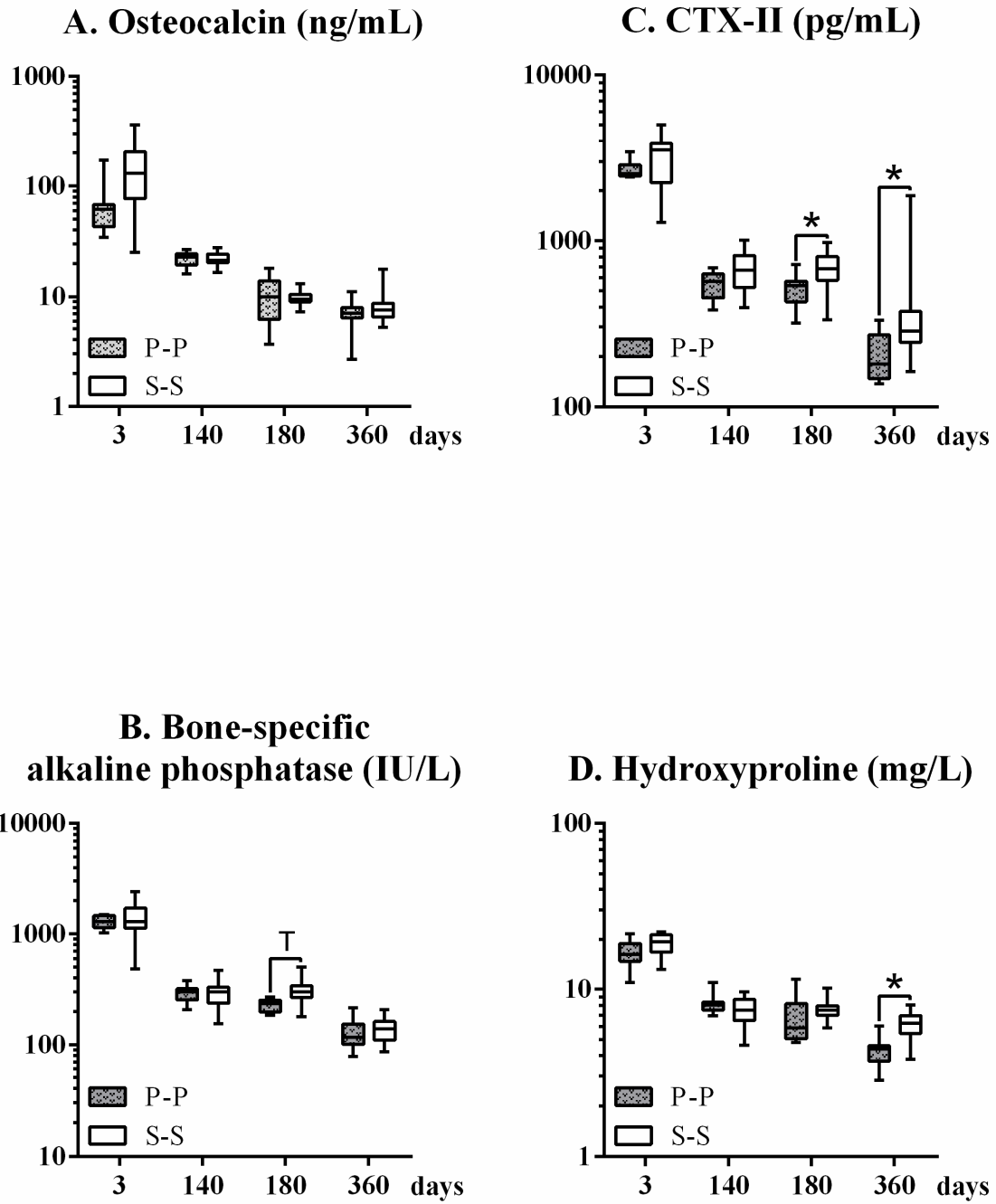




FIGURE 4



**FIGURE 5**

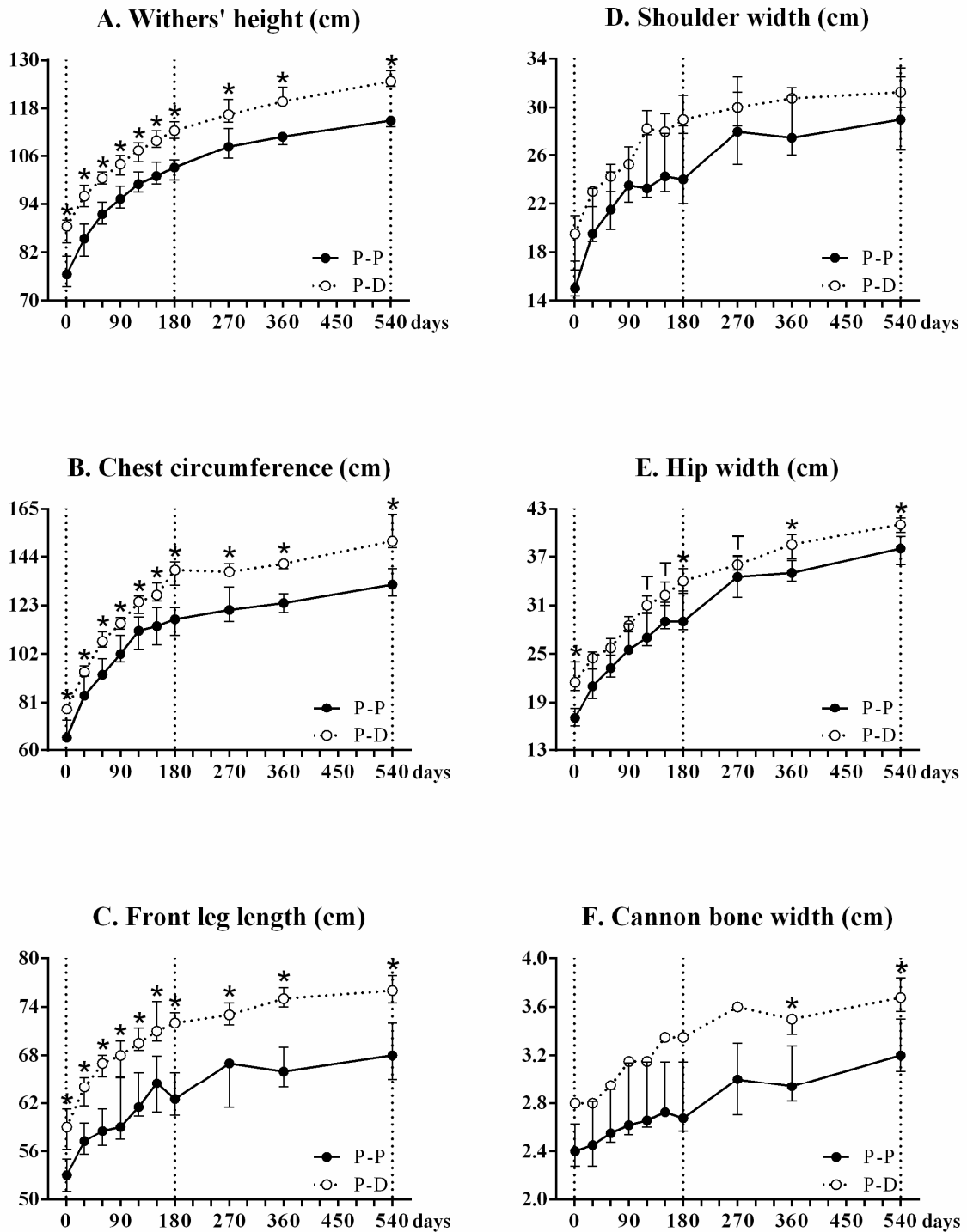
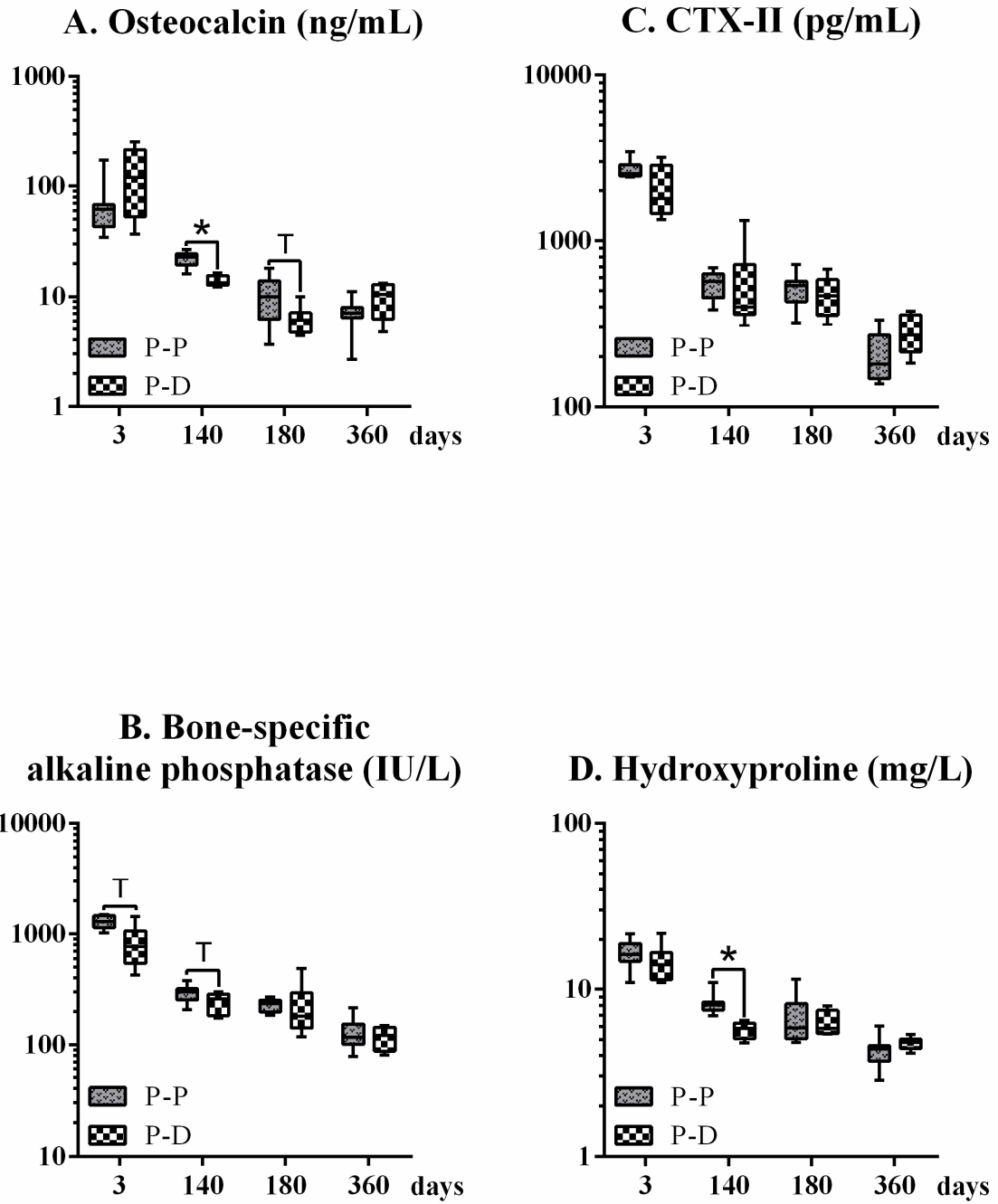


FIGURE 6



**FIGURE 7**

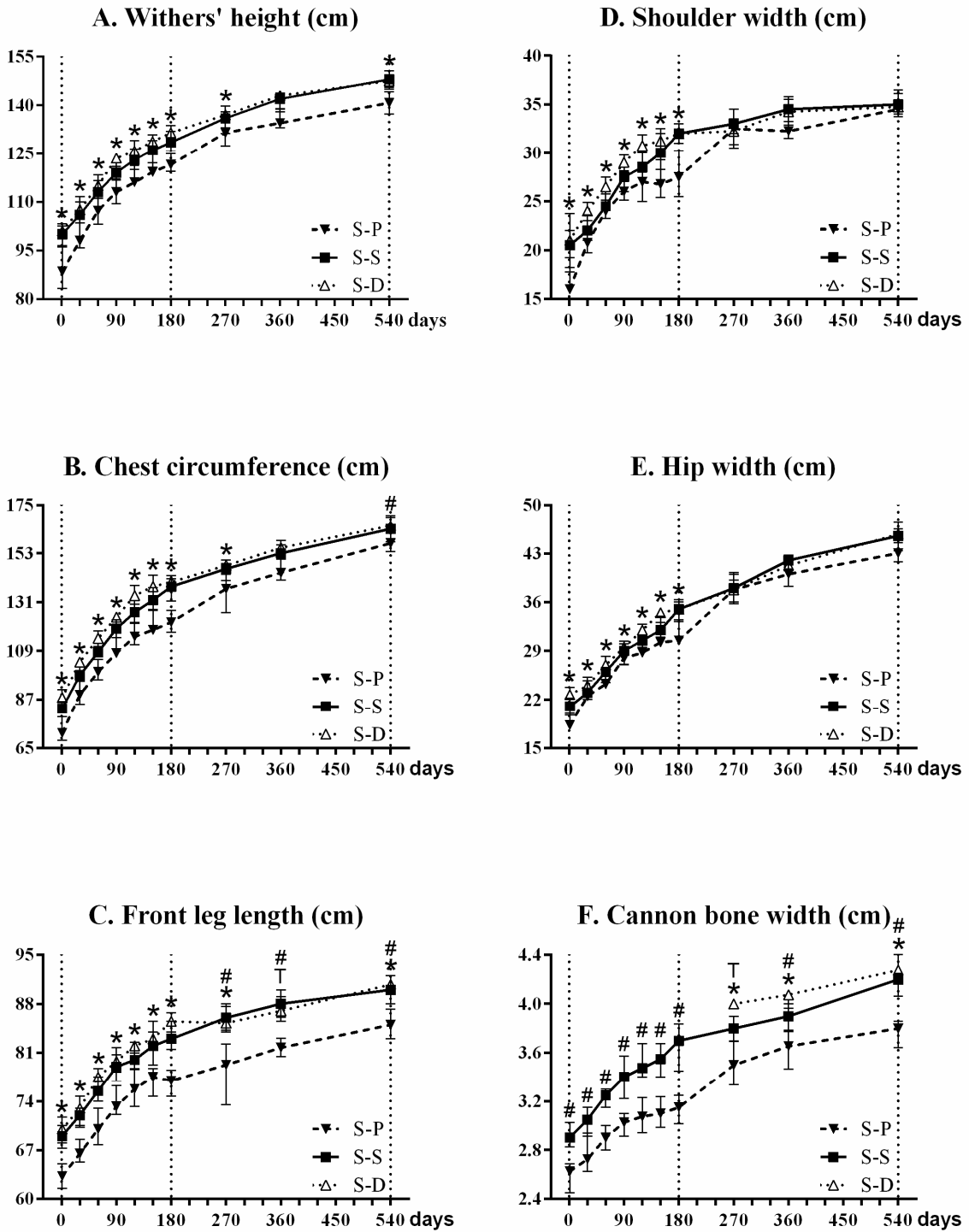


FIGURE 8

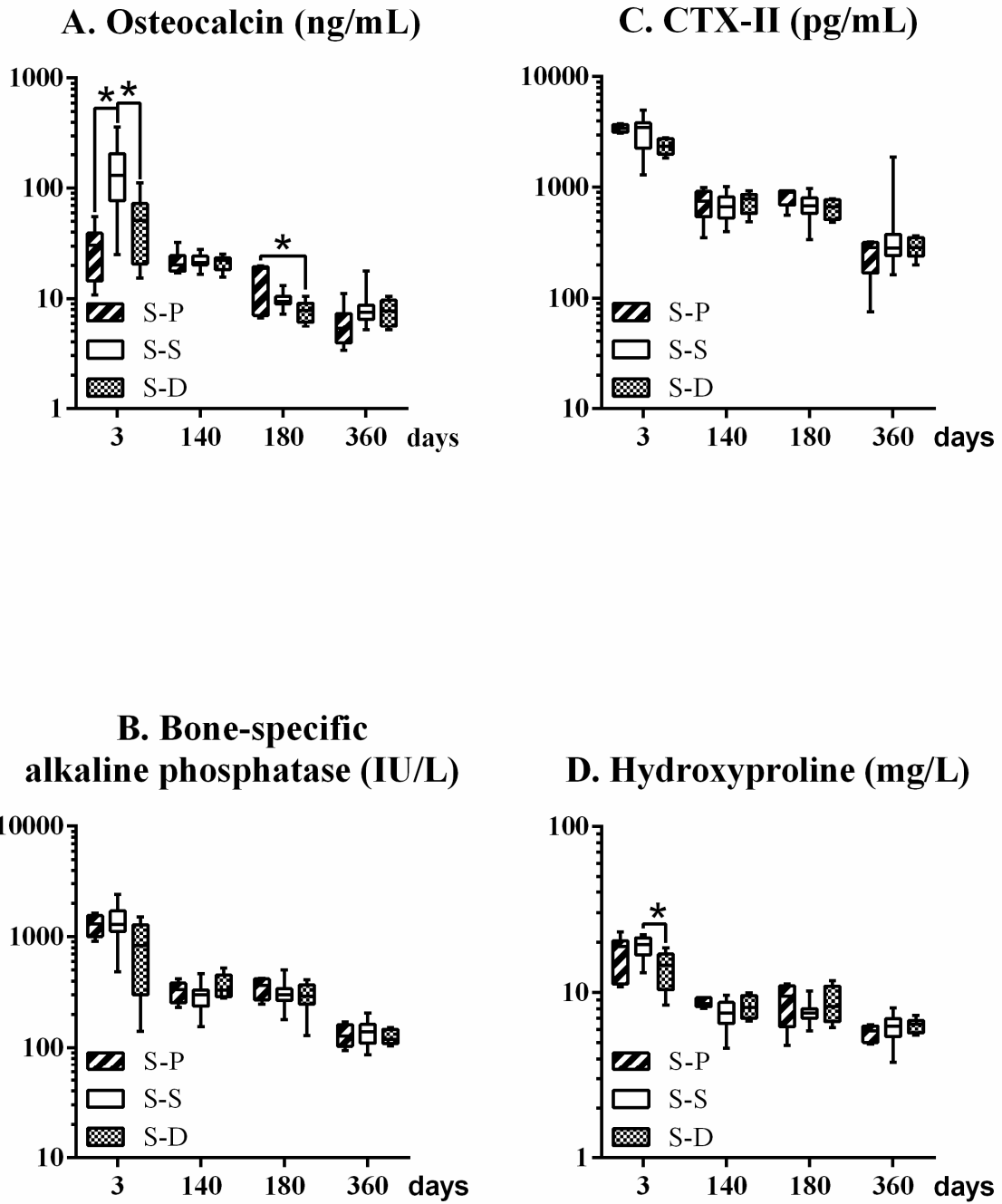
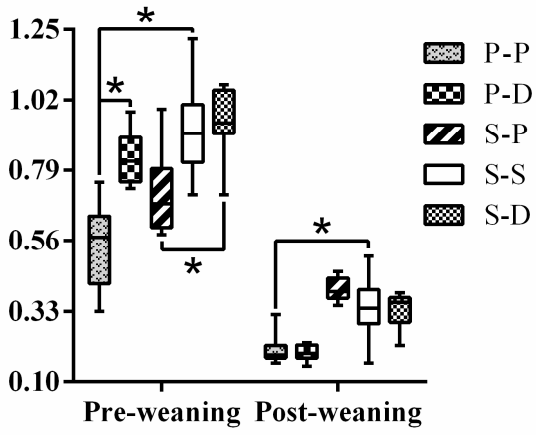
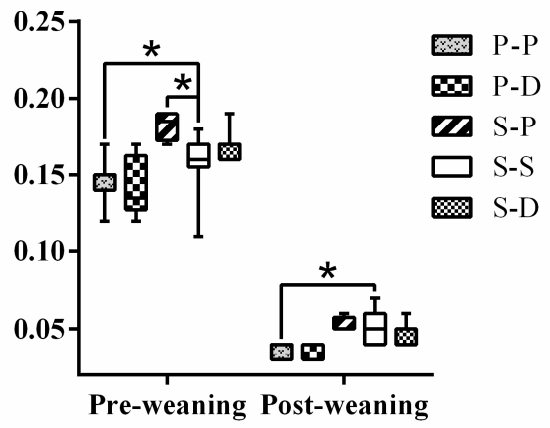


FIGURE 9

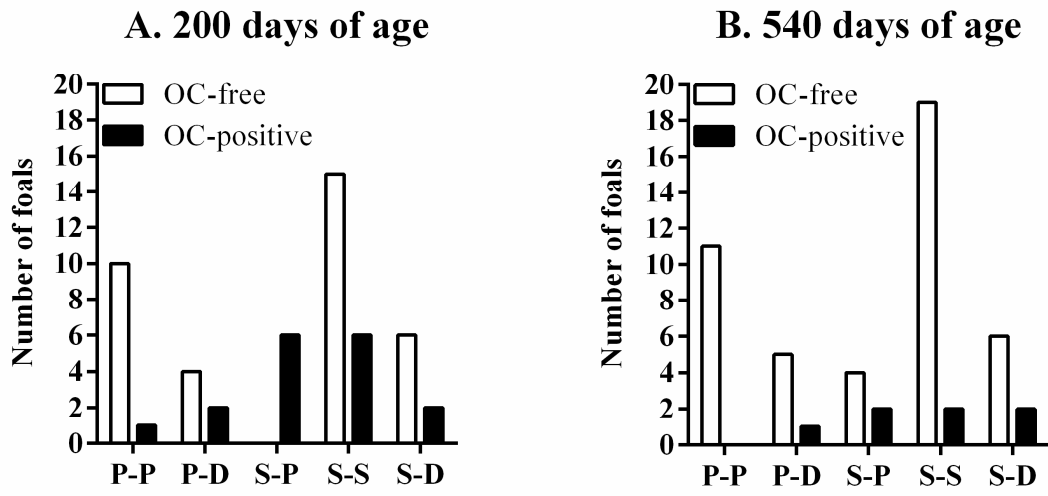
A. Daily weight gain (kg/day)



B. Daily height gain (cm/day)



**FIGURE 10**



## **2.5. Article: “Intra-uterine growth enhancement or restriction after between-breed embryo transfer is associated with structural and functional alterations of the equine term placenta”**

**Peugnet P**, Valentino S, Robles M, Dahirel M, Aubrière MC, Wimel L, Duchamp G, Chaffaux S, Dubois C, Reigner F, Serteyn D, Tarrade A, Chavatte-Palmer P

*Article en préparation pour soumission à Reproduction.*





# **Intra-uterine growth enhancement or restriction after between-breed embryo transfer is associated with structural and functional alterations of the equine term placenta**

Peugnet P.<sup>a</sup>, Valentino S.<sup>a</sup>, Robles M.<sup>a</sup>, Dahirel M.<sup>a</sup>, Aubrière M.C.<sup>a</sup>, Wimmel L.<sup>b</sup>, Duchamp G.<sup>c</sup>, Chaffaux S.<sup>a</sup>, Dubois C.<sup>b</sup>, Reigner F.<sup>c</sup>, Serteyn D.<sup>d</sup>, Tarrade A.<sup>a,e</sup>, Chavatte-Palmer P.<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France; <sup>b</sup>IFCE, Station Expérimentale de la Valade, F-19370 Chamberet, France; <sup>c</sup>INRA, UE1293, F-37380 Nouzilly, France; <sup>d</sup>Clinique équine, Faculté de Médecine Vétérinaire, CORD, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique; <sup>e</sup>PremUp Fondation, F-75006 Paris, France

## **Corresponding author:**

Dr Pascale Chavatte-Palmer / INRA - UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction / Domaine de Vilvert / F-78350 Jouy en Josas / France / pascale.chavatte@jouy.inra.fr / +33 1 34 65 25 58

## **Keywords**

Fetal programming, placenta, stereology, gene expression, embryo transfer, horse

## **Abstract**

**Introduction:** In horses, fetal growth is largely determined by maternal uterine size. For embryo transfer practice, recipients of different breeds are often used but effects have not been evaluated.

**Methods:** Fetal growth was enhanced by transferring pony (P-D) or saddlebred embryos into draft mares (S-D). Growth restriction was obtained by transferring saddlebred embryos into ponies (S-P). Control P-P, S-S and D-D pregnancies were obtained by artificial insemination. Placental gross morphology, stereology and expression of genes involved in nutrient transfer, vascularization and growth by RT-qPCR was analyzed.

**Results:** Placental weight and surface area were increased in S-S and D-D vs P-P and in D-D vs S-S. Absolute surface and volume of trophoblast and microcotyledonary vessels were higher in S-S and D-D vs P-P. The expression of most genes was decreased in P-P vs other breeds. P-D foals were 57% heavier than P-P foals and S-D foals were 9% heavier than S-S, with heavier and larger placentas. Absolute trophoblast surface and volume were not different, although absolute surface and volume of microcotyledonary vessels were increased in P-D vs P-P. Transcript levels remained unchanged in overgrown placentas vs controls. S-P foals were 37% lighter vs S-S foals, with smaller placentas than S-S and S-D. There was no difference in absolute values in S-P vs S-S and S-D placentas, but *IGF2* and *SLC38A2* expression was reduced in S-P vs S-S and/or S-D.

**Conclusion:** Intra-uterine growth manipulation led to marked changes in placental morphology, morphometry and gene expression which may lead to post-natal effects.

## Introduction

Developmental conditions determine some of the metabolic characteristics of adults [1-4], with a U-shaped curve of increased risk both in small and large for gestational age children [5,6]. This can also be applied to the Horse industry [7,8]. About 15,000 and 3,000 equine embryos were transferred, respectively, in the USA and in Europe in 2012 [9]. The choice of the recipient mare (conformation and breed) may modify fetal growth and induce detrimental effects in the foals. To evaluate these effects, an experimental model of enhanced *versus* deprived fetal growth was obtained by transferring pony embryos into Thoroughbred mares and *vice versa*. Shortly after birth, enlarged pony foals had increased pancreatic  $\beta$  cell sensitivity to glucose [10] and reduced catecholamine response to acute stress [11]. Their growth was increased compared to controls until 3 years of age [12,13]. Conversely, scaled-down Thoroughbred newborns had an enhanced catecholamine response to acute stress shortly after birth [11] and caught up with controls by 3 years of age [12,13].

The placental ability to transfer adequate nutrient supply to the fetus is determined by placental growth and size, morphology, blood flow, transporter abundance and placental intrinsic nutrient consumption and production [14-16]. The role of the placenta in developmental programming is supported by epidemiological observations and experimental models [15,17]. In equids, placentation is non-invasive, diffuse and epitheliochorial. Microcotyledons with intense branching maximize the contact surface between endometrium and trophoblast for hemotrophic exchanges. Histotrophic exchanges take place in-between the microcotyledonary units, where trophoblastic cells become pseudo-stratified and specifically adapted to

absorb the exocrine material from the uterine glands [18-20]. Placental structure was pointed out as the primary control mechanism for alterations in foals' growth and metabolism in Allen's experiment using pony and Thoroughbred embryo transfers [13]. Functional mechanisms associated with these structural changes remained uninvestigated.

Here, fetal growth was reduced by transferring saddlebred embryos into pony mares or increased by transferring pony or saddlebred embryos into draft mares (*Peugnet et al. submitted*). Placental development was investigated in terms of morphology, histology, stereology and gene expression.

## **Materials and methods**

Animal studies were approved by the local animal care and use committee and received ethical approval from the local ethics committee ("CREEAL") under number 5-2013-5.

The study was conducted over 2 successive breeding seasons (foaling in 2011 and 2012). Pony mares (n=27) were housed and pony embryos (n=61) were produced at the "Institut National de la Recherche Agronomique" experimental farm (farm 1, 47°32'36.12"N, 0°44'38.96"E, 120 m). Saddlebred (n=28) and draft (n=22) mares were housed and saddlebred embryos (n=48) were produced at the "Institut Français du Cheval et de l'Équitation" experimental farm (farm 2, 45°34'55.17"N, 1°43'16.29"E, 442 m). Median mares' age was 6.2 years (range 3-19 years).

Primiparous and multiparous mares (up to 10 gestations) were used. The experimental protocol is summarized in Supplementary Figure 1.

### ***Control pregnancies***

Pony-in-Pony (P-P, n=21), Saddlebred-in-Saddlebred (S-S, n=28) and Draft-in-Draft (D-D, n=8) pregnancies were obtained by artificial insemination using semen from 1 pony, 2 saddlebred and 1 draft stallion, respectively. Follicular growth and ovulation were monitored by ultrasonography to determine the timing of insemination. Pregnancy was checked 14 days after ovulation by ultrasonography.

### ***Experimental pregnancies***

Pony-in-Draft (P-D), Saddlebred-in-Pony (S-P) and Saddlebred-in-Draft (S-D) pregnancies were obtained using standard embryo transfer procedures [21]. Recovered Day 7 embryos were washed in Emcare Holding<sup>®</sup> solution (ICPbio), transported in Equitainer<sup>®</sup> (Hamilton Research) to the other experimental farm (3-4 hours) and transferred immediately into synchronized recipients 5-7 days post-ovulation. Pregnancy was diagnosed by ultrasonography after 7 days.

### ***Mares Management and placental sampling***

From ovulation, mares were kept on pasture with free access to mineral salts. From the 5<sup>th</sup> gestational month, mares were housed in boxes and fed a diet based on

straw and hay with concentrates in farm 1 and either homemade pellets or moha hay in farm 2, with free access to mineral salts (Supplementary Table 1).

At delivery, allantochorion was sampled near the umbilical cord: 1 cm<sup>2</sup> fragments were fixed in 4% formaldehyde for histological analysis and 3 mm<sup>2</sup> fragments were snap-frozen in liquid nitrogen for molecular analysis. Foals and fetal annexes (allantochorion with amnios) were weighed the next morning and the gross allantochorion surface measured as described previously [22].

### ***Histological and stereological analysis***

Allantochorion samples were embedded in paraffin. Sections (7µm) were stained with hematoxylin/eosin and scanned using NanoZoomer Digital Pathology<sup>®</sup> (Hamamatsu Photonics). Trophoblast, microcotyledonary vessels, connective tissue vessels and connective tissue relative surface (Sv) and relative volume (Vv) were measured by One Stop Stereology (MercatorPro<sup>®</sup>, ExploraNova, [23]).

### ***Gene expression analysis***

Total RNA from allantochorion samples was isolated as previously described [24] and purified using the RNeasy<sup>®</sup> Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and real time quantitative PCR were performed as previously described [25]. Gene-specific primers are shown in Table 1. Data were analyzed using QbasePLUS<sup>®</sup> (Biogazelle). Calibrated normalized relative quantities (CNRQ) were also calculated as previously described [25]. *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase), *RPL32* (Ribosomal Protein L32) and *SCAMP3*

(Secretory Carrier Membrane Protein 3) [26], as selected by geNorm, were used as reference genes.

### ***Statistical analysis***

Data are presented as medians [quartile1-quartile3]. Statistical analyses were performed using R software ([www.r-project.org/](http://www.r-project.org/), version i386-2.15.2). Breed (P-P vs S-S vs D-D) and maternal environment (P-P vs P-D and S-P vs S-S vs S-D) effects were tested. After verification of homogeneity of variances, data were analyzed by non-parametric ANOVA using permutations (aovp function, lmPerm package, <http://cran.r-project.org/web/packages/lmPerm/index.html>), with group, parity (primiparous vs multiparous), foal sex and breeding season as cofactors. If the overall effect was significant, pairwise comparisons using permutational t tests were performed.  $p < 0.05$  was considered significant.

## **Results**

### ***Pregnancies***

Pregnancy data are shown in Table 2: 21 P-P, 28 S-S and 8 D-D control and 6 P-D, 6 S-P and 8 S-D experimental foals were delivered spontaneously during spring and summer (range April 6<sup>th</sup>-August 13<sup>th</sup>) with >75% in May/June, all within the normal gestational age range. There were no effects of parity and fetal sex on pregnancy length in any group. Pregnancy length was similar in control pregnancies with no effect of the breeding season. Pregnancy was 6 days shorter in P-D vs P-P



( $p=0.019$ ), with a breeding season effect ( $p=0.007$ ): pregnancy was 11 days shorter in P-P and 10 days shorter in P-D in 2012 vs 2011). Conversely, pregnancy was 13 days longer in S-P vs S-S ( $p=0.010$ ) and 16 days longer in S-P vs S-D ( $p=0.003$ ) without breeding season effect. Gestation length was unchanged between S-D and S-S.

### ***Parturition***

All foals were healthy at birth, but for 2 S-P foals (out of 6) that needed assistance to stand and suckle from the dam for the first hours after birth. They were bottle-fed with colostrum and ewe milk until first suckling. Birth weights are shown in Figure 1. Control P-P foals were lighter than S-S ( $p=0.003$ ) and D-D foals ( $p=0.003$ ). S-S foals were lighter than D-D foals ( $p=0.003$ ). In S-S, primiparous dams delivered lighter foals (-11.7 kg,  $p=0.001$ ) than multiparous mares. P-D foals were heavier than P-P (+57.3%,  $p<0.001$ ). Pony foals from both groups were lighter by 3.5 kg in 2012 vs 2011 ( $p=0.001$ ). S-P and S-D foals were respectively lighter (-37.2%,  $p=0.003$ ) and heavier (+8.9%,  $p=0.056$ ) than S-S. S-P foals were lighter by 36.8% than S-D ( $p=0.003$ ).

### ***Placental morphology***

Median placental mass, surface area and efficiency are shown in Figure 1. P-P placentas were lighter and smaller than S-S ( $p=0.003$  and  $p=0.003$ ) and D-D placentas ( $p=0.003$  and  $p=0.003$ ). Only the surface area was reduced in S-S vs D-D placentas ( $p=0.011$ ). In S-S and D-D, primiparous dams delivered lighter placentas

( $p=0.034$  and  $p=0.047$ ). Placental efficiency did not differ between P-P and S-S but was increased in D-D vs S-S ( $p=0.048$ ). P-D placentas were heavier ( $p<0.001$ ) and larger ( $p<0.001$ ) than P-P controls, with placental efficiency tending to decrease ( $p=0.053$ ). S-P and S-D placental weights were respectively reduced ( $p=0.003$ ) and increased ( $p=0.017$ ) vs S-S controls. The same effect was observed for placental size ( $p=0.003$  in S-P vs S-S and  $p=0.040$  in S-D vs S-S). Both placental weight and surface area differed between S-P and S-D ( $p=0.003$  and  $p=0.003$ ). Placental efficiency was unchanged between S-P, S-S and S-D.

### ***Placental morphometry***

Histological sections of placentas are shown in Figure 2. No gross difference was observed between controls and experimental groups. Stereological data are shown in Figure 3 A, C, E, G. No difference was found between controls. Trophoblast Sv ( $p=0.017$ ) and connective tissue Vv ( $p=0.047$ ) were decreased in P-D vs P-P, whereas connective tissue vessels Vv tended to increase ( $p=0.065$ ). In contrast, trophoblast Sv ( $p=0.027$ ) and microcotyledonary vessels Sv ( $p=0.072$ ) increased or tended to increase in S-P vs S-D. Microcotyledonary vessels Vv was increased in S-P vs S-S ( $p=0.012$ ). There was no effect in S-S vs S-D. *Absolute values* - Here, allantochorion volumes were missing. Allantochorion volumes, however, were measured in 27 saddlebred mares in 2013. A linear relation was found with placental weight (volume (L) =  $0.89 \times$  weight (kg)). This relation was extrapolated to the present study and total placental volumes were estimated, as well as absolute surface and volume of stereological parameters (Figure 3 B, D, F, H).

Absolute surface and volume of trophoblast and microcotyledonary vessels were reduced in P-P vs S-S placentas ( $p=0.003$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.008$  and  $p=0.021$ , respectively) and D-D placentas ( $p=0.003$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.003$  and  $p=0.021$ , respectively). Absolute surface and volume of microcotyledonary vessels were increased in P-D vs P-P ( $p=0.023$  and  $p=0.001$ , respectively). No difference was found between groups of saddlebred placentas for surface and volume of both structures.

### ***Placental gene expression***

Studied genes are listed in Table 1. CNRQ of differentially expressed genes are shown in Table 3. Relative expression of *IGF2*, *IGF1R*, *IGF2R* and *TGF $\beta$ 1* was higher in S-S vs P-P placentas ( $p=0.010$ ,  $p=0.006$ ,  $p=0.003$  and  $p=0.003$ ) and that of *IGF2*, *IGF1R* and *IGF2R* higher in D-D vs P-P placentas ( $p=0.006$ ,  $p=0.006$  and  $p=0.006$ ). Relative expression of *IGF2* tended to be lower and that of *TGF $\beta$ 1* was higher in S-S vs D-D placentas ( $p=0.055$  and  $p=0.018$ ). *IGF1R* values were lower in primiparous compared to multiparous mares in the P-P and D-D groups ( $p=0.028$ ). *IGF1R* expression was also reduced in 2012 vs 2011 in S-S ( $p=0.010$ ). *IGF2* expression was reduced in S-P vs S-S ( $p=0.009$ ) and S-D ( $p=0.050$ ) placentas. Relative expression of *SLC2A1*, *SLC38A2* and *LPL* was higher in S-S vs P-P placentas ( $p=0.003$ ,  $p=0.011$  and  $p=0.006$ , respectively). *SLC38A2* expression was reduced in S-P vs S-S ( $p=0.021$ ). *SLC38A2* expression tended to be lower in S-P female vs S-P male placentas ( $p=0.067$ ). Relative expression of *KDR* was higher in D-D vs P-P ( $p=0.003$ ) and higher in D-D vs S-S ( $p=0.003$ ).

## Discussion

Strong breed specificities were observed in placentas and were expected on weights and surface areas. Despite no histological differences, genes mostly involved in feto-placental growth and nutrient transport had their expression decreased in pony placentas compared to saddlebred or draft placentas.

Embryo transfer into a breed of a different size induced fetal overgrowth or growth restriction. Overgrowth was associated with increased placental size and weight in ponies and saddlebreds, whereas growth restriction was associated with a decrease in both parameters, compared to controls. Although trophoblast Sv was reduced in overgrown ponies, gene expression remained unchanged. In contrast, trophoblast Sv and microcotyledonary vessels Sv and Vv were increased in restricted saddlebred placentas compared to control or overgrown saddlebreds, with a reduced expression of *IGF2* and *SLC38A2*.

Although pregnancy length is usually shorter in ponies [13,27], no breed effect was observed here. Pregnancy was shorter in overgrown P-D vs P-P, P-D foals being heavier than P-P foals. This probably indicates an earlier maturation since those foals were not dysmature at birth [28,29]. Conversely, pregnancy was longer in restricted S-P, with lighter foals compared to other groups. The mechanism leading to earlier parturition might be related to an advanced or delayed cortisol surge in fetuses, in direct relation with genetic fetal growth potential as a proxy for readiness for birth [28,30,31].

Placental weight and surface area increased with breed size, although placental weight was similar between both largest breeds. Placental weight was increased in multiparous saddlebred and draft mares as previously described [32]. Placental efficiency was increased in control draft vs saddlebred dams, indicating breed further differences than just size and weight.

As expected [13], placental size and weight were increased for overgrown pony and saddlebred foals compared to controls, but placental efficiency was reduced in P-D vs P-P. This may be because in P-D pregnancies, placental weight increased more than foal birth weight did. Thus, a pony fetus growth remains limited by its genetic potential, even when transferred in a lush intra-uterine environment. This was not the case for S-D, for which placental efficiency remained unchanged compared to S-S. This may be due to the fact that saddlebred foals are closer to draft foals in terms of conformation.

Stereological data confirm previous data in ponies and Thoroughbreds [22,27], although no difference was found for Sv and Vv of microcotyledonary components. In pigs, where placentation is also diffuse and epitheliochorial, placental vascular density and surface area are reduced in the smaller Meishan compared to the larger European Yorkshire breed. In contrast to the present study, however, the Meishan breed compensates for smaller exchange surface area by an increased placental vascular density [33].

Trophoblast Sv and connective tissue Vv were reduced and connective tissue vessels Vv increased in P-D vs P-P. Trophoblast and microcotyledonary vessels Sv and microcotyledonary vessels Vv were reduced in S-D vs S-P. There was no effect in S-S vs S-D. The surface and volume of microcotyledonary vessels, however, were

higher in P-D than P-P placentas. Sv data are in contrast with Allen's work demonstrating an increase in microcotyledonary Sv in ponies-in-Thoroughbreds [22]. Absolute values, however, are increased in both studies and agree with the present macroscopic evaluation which indicates reduced placental efficiency. Maternal parity affects microcotyledonary growth, with reduced Sv in maiden and old mares [34]. Here, maternal parity was included in the statistical model, in contrast to Allen's work, which may explain some of the observed difference.

Trophoblast and microcotyledonary vessels Sv were higher in S-P than S-D placentas, suggesting an adaptation in restricted saddlebred fetuses, so as to increase surface exchange, although comparison of absolute values did not reach statistical significance. These data are in contrast to Allen's work where Thoroughbreds-in-ponies placentas had a lower microcotyledonary Sv than control Thoroughbred placentas [22].

Gene expression was lower in pony than saddlebred or draft placentas. Expression of growth factors and their receptors (IGF2, IGF1R and IGF2R, TGF $\beta$ 1), of transporters and enzymes involved in nutrient exchanges (SLC2A1, SLC38A2 and LPL) and of the VEGF $\alpha$  receptor KDR involved in placental vascularization, were down-regulated in pony pregnancies compared to saddlebred or draft pregnancies. In pigs, comparisons between Asian and European breeds demonstrated differences in placental expression of genes involved in key metabolic pathways, which could be related to different fetomaternal metabolisms [35-37].

No differential gene expression was associated with enhanced fetal growth [38]. It may be because placentas were collected at term, reflecting only terminal result of the pregnancy or because the increase in growth was driven through other

factors than those studied. Alternatively, fetal growth may have mainly been driven by the increased placental size due to the increased uterine capacity. In overgrown ponies-in-Thoroughbreds, insulin secretion was increased in response to a glucose injection one day after birth [10]. Here, insulin secretion was also increased in P-D foals [39]. If present in the fetus, this increase may have driven fetal overgrowth.

*IGF2* expression was reduced in S-P compared to S-S and S-D placentas. In mice, the IGF2/H19 pathway regulates fetal growth *via* placental growth. Deletion of different *IGF2* promoters induces placental and fetal weight reduction [40]. *SLC38A2* expression was shown to decrease in the placenta of intra-uterine growth retarded human fetuses [41] and rats [42]. This may be a common response to growth restriction in mammals.

## **Conclusion**

In horses, between-breed embryo transfers lead to enhanced or restricted fetal growth. This correlates with placental growth, with morphometric changes in both trophoblast and microcotyledonary vessels and changes in the expression of genes involved in fetoplacental growth and nutrient transfer. Phenotypic and physiological study of the preweaning foals demonstrates that post-natal growth and metabolism are affected (*Peugnet et al, submitted*). Further investigations will focus on mechanisms relating placental effects to post-natal phenotype, in particular using high throughput genomic and epigenetic approaches. In practice, the present data demonstrate that special care should be paid to recipient mare selection for embryo transfer in horses.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to Joseph Bellonie, Patrice Dupuis, Philippe Barrière, Thierry Gascogne, Thierry Blard, Yvan Gaudé and François Stieau for care and management of the mares and foals.

## **References**

- [1] Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nature Reviews Endocrinology*. 2009;5(11):604-10.
- [2] McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: The role of periconceptual and foetal nutrition. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2008;102(2):82-9.
- [3] Barker DJ. The developmental origins of well-being. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359(1449):1359-66.
- [4] Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol*. 2006;49(2):270-83.
- [5] Zhao Y, Wang SF, Mu M, Sheng J. Birth weight and overweight/obesity in adults: a meta-analysis. *European journal of pediatrics*. 2012;171(12):1737-46.
- [6] Ford SP, Long NM. Evidence for similar changes in offspring phenotype following either maternal undernutrition or overnutrition: potential impact on fetal epigenetic mechanisms. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24:105-11.
- [7] Satterfield MC, Coverdale JA, Wu GY. Review of fetal programming: implications to horse health 2010. 207-14 pp.



- [8] Fowden A, Jellyman JK, Valenzuela OA, Forhead AJ. Nutritional Programming of Intrauterine Development: A Concept Applicable to the Horse? *J equine vet sci.* 2013;33:295-304.
- [9] Perry G. IETS 2013 Statistics and Data Retrieval Committee Report: 2012 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals *Embryo Transfer Newsletter.* 2013;31(4):24-46.
- [10] Forhead AJ, Ousey JC, Allen WR, Fowden AL. Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *Journal of Endocrinology.* 2004;181(3):459-67.
- [11] Giussani DA, Forhead AJ, Gardner DS, Fletcher AJW, Allen WR. Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *J Physiol.* 2003;547(1):67-76.
- [12] Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction.* 2004;127(1):67-77.
- [13] Allen WR, Wilsher S, Turnbull C, Stewart F, Ousey J, Rossdale PD, et al. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction.* 2002;123(3):445-53.
- [14] Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond).* 2007;113(1):1-13.
- [15] Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. The Placenta and Intrauterine Programming. *Journal of Neuroendocrinology.* 2008;20(4):439-50.
- [16] Belkacemi L, Nelson DM, Desai M, Ross MG. Maternal Undernutrition Influences Placental-Fetal Development. *Biology of Reproduction.* 2010;83(3):325-31.

- [17] Reynolds LP, Caton JS. Role of the pre- and post-natal environment in developmental programming of health and productivity. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;354(1-2):54-9.
- [18] Allen WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction.* 2001;121(4):513-27.
- [19] MacDonald AA, Chavatte P, Fowden AL. Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. *Placenta.* 2000;21((5-6)):565-74.
- [20] Steven DH, Samuel CA. Anatomy of the placental barrier in the mare. *J Reprod Fert.* 1975;Suppl. 23:579-82.
- [21] McKinnon AO, Squires EL. *Embryo Transfer and Related Technologies.* Gold Coast, Australia; p. 27-57.
- [22] Allen WR, Wilsher S, Stewart F, Stewart F, Ousey J, Ousey J, et al. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. *J Endocrinol.* 2002;172(2):237-46.
- [23] Reed MG, Howard CV, De Yanés GS. One-stop stereology: the estimation of 3D parameters using isotropic rulers. *J Microsc.* 2010;239(1):54-65.
- [24] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
- [25] Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Aubrière MC, Peynot N, Dahirel M, Bertrand-Michel J, et al. Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a high fat and control maternal diets in a rabbit model. *Plos One.* 2013;8(12):e83458.

- [26] Brosnahan MM, Miller DC, Adams M, Antczak DF. IL-22 is expressed by the invasive trophoblast of the equine (*Equus caballus*) chorionic girdle. *J Immunol.* 2012;188(9):4181-7.
- [27] Veronesi MC, Villani M, Wilsher S, Contri A, Carluccio A. A comparative stereological study of the term placenta in the donkey, pony and Thoroughbred. *Theriogenology.* 2010;74(4):627-31.
- [28] Rossdale PD, Silver M. The concept of readiness for birth. *J Reprod Fert, Suppl.* 1982;32:507-10.
- [29] Silver M, Fowden AL. Induction of labour in domestic animals: endocrine changes and neonatal viability. 1988; (Ed.) Kunzell W and Jensen A. pp. 401-11. Heidelberg: Springer.
- [30] Rossdale PD, Ousey JC, Chavatte P. Readiness for birth: an endocrinological duet between fetal foal and mare. *Equine Vet J.* 1997;24:96-9.
- [31] Silver M. Prenatal maturation: the timing of birth and how it may be regulated in domestic animals. *Exp Physiol.* 1990;75:285-307.
- [32] Elliott C, Morton J, Chopin J. Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. *Theriogenology.* 2009;71(4):683-9.
- [33] Biensen NJ, Wilson ME, Ford SP. The impact of either a Meishan or Yorkshire uterus on Meishan or Yorkshire fetal and placental development to days 70, 90, and 110 of gestation. *J Anim Sci.* 1998;76(8):2169-76.
- [34] Wilsher S, Allen WR. The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. *Equine vet J.* 2003;35:476-83.
- [35] Hong L, Hou C, Li X, Li C, Zhao S, Yu M. Expression of heparanase is associated with breed-specific morphological characters of placental folded bilayer between yorkshire and meishan pigs. *Biol Reprod.* 2014;90(3):56.

- [36] Bischoff SR, Tsai SQ, Hardison NE, Motsinger-Reif AA, Freking BA, Nonneman DJ, et al. Differences in X-chromosome transcriptional activity and cholesterol metabolism between placentae from swine breeds from Asian and Western origins. *PLoS One*. 2013;8(1):e55345.
- [37] Hernandez SC, Hogg CO, Billon Y, Sanchez MP, Bidanel JP, Haley CS, et al. Secreted phosphoprotein 1 expression in endometrium and placental tissues of hyperprolific large white and meishan gilts. *Biol Reprod*. 2013;88(5):120.
- [38] Constancia M, Angiolini E, Sandovici I, Smith P, Smith R, Kelsey G, et al. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the *Igf2* gene and placental transporter systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(52):19219-24.
- [39] Peugnet P, Tarrade A, Sandersen C, Dahirel M, Guillaume D, Wimel L, et al. Effects of embryo transfer in a larger breed on postnatal growth and glucose metabolism in horses. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25:228 (abstract).
- [40] Sferruzzi-Perri AN, Vaughan OR, Coan PM, Suciuc MC, Darbyshire R, Constancia M, et al. Placental-specific *Igf2* deficiency alters developmental adaptations to undernutrition in mice. *Endocrinology*. 2011;152(8):3202-12.
- [41] Mando C, Tabano S, Pileri P, Colapietro P, Marino MA, Avagliano L, et al. SNAT2 expression and regulation in human growth-restricted placentas. *Pediatr Res*. 2013;74(2):104-10.
- [42] Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, Ericsson A, Palmberg I, Tranberg M, et al. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J Physiol*. 2006;576(3):935-46.

## FIGURES

**FIGURE 1.** Foal birth weight (A), placental mass (amnios + allantochorion mass, B), allantochorion surface area (C) and placental efficiency (birth weight to placental mass, D) within the 6 groups of pregnancies. P-P (full yellow, n=21): Pony-in-Pony; P-D (chequered blue, n=6): Pony-in-Draft; S-P (striped pink, n=6): Saddlebred-in-Pony; S-S (full green, n=28): Saddlebred-in-Saddlebred; S-D (chequered red, n=8): Saddlebred-in-Draft; D-D (full purple, n=8): Draft-in-Draft. Boxplots of controls with different superscripts (a, b, c) and boxplots of experimental groups under the asterisks are significantly different (ANOVA using permutation tests followed by pairwise comparison tests,  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 2.** Histological sections of term allantochorion within the 6 groups, showing the allantois (a) and the connective tissue (ct) with its fetal vessels (vc) above which the histotrophic trophoblast (hi) and then the microcotyledons (m) with the hemotrophic trophoblast and fetal vessels. Hematoxylin/eosin staining. P-P (A): Pony-in-Pony; P-D (D): Pony-in-Draft; S-P (E): Saddlebred-in-Pony; S-S (B): Saddlebred-in-Saddlebred; S-D (F): Saddlebred-in-Draft; D-D (C): Draft-in-Draft.

**FIGURE 3.** Surface density (Sv) and volume fraction (Vv) for the trophoblast (A, C) and microcotyledonary vessels (E, G) and absolute surface and volume for the trophoblast (B, D) and microcotyledonary vessels (F, H) within the 6 groups of placentas. P-P (full yellow, n=19): Pony-in-Pony; P-D (chequered blue, n=4): Pony-in-Draft; S-P (striped pink, n=6): Saddlebred-in-Pony; S-S (full green, n=18): Saddlebred-in-Saddlebred; S-D (chequered red, n=8): Saddlebred-in-Draft; D-D (full

purple, n=8): Draft-in-Draft. Boxplots of experimental groups under the asterisks are significantly different (ANOVA using permutation tests followed by pairwise comparison tests,  $p < 0.05$ ).

**TABLE 1.** Gene-specific primers and accession number or reference.

<b>Candidate gene</b>	<b>Forward and reverse primers</b>	<b>Accession number</b>
<i>H19</i>	F 5'-GGACCCCAAGAACCCTCAAG-3' R 5'-GGGACTTGAAGAAGTCCGGG-3'	NR_027326
<i>IGF2</i>	F 5'-TTTCTTGGCTTTTGCCTCGT-3' R 5'-CCTGCTGAAGTAAAAGCCGC-3'	NM_001114539.1
<i>IGF1-R</i>	F 5'-CGAGAAGACCACCATCAACAAC-3' R 5'-TGGCAGCACTCGTTGTTCTC-3'	XM_001489765.2
<i>IGF2-R</i>	F 5'-GTCGGCTTGCCAGATGAGAT-3' R 5'-TACTGATGGAGACGGCCTCA-3'	XM_001491469.2
<i>EGF-R</i>	F 5'-GTCTGGAAGTTTGC GGATGC-3' R 5'-CTTGGGCCATTCTTGCAC-3'	XM_001497730.2
<i>TGFβ1</i>	F 5'-TTGATGTCACCGGAGTCGTG-3' R 5'-CCACGCGGAGTGTGTTATCT-3'	NM_001081849.1
<i>SLC2A1</i>	F 5'-TGTGCTCATGACCATCGCC-3' R 5'-AAGCCAAAGATGGCCACGAT-3'	NM_001163971.1
<i>SLC38A1</i>	F 5'-AAATGAACTACCCTCCGCCA-3' R 5'-ACACAGAGGGAGAATTATGCCAA-3'	XM_001489402.
<i>SLC38A2</i>	F 5'-ACAGCTCGAACAGCGACTTCA-3' R 5'-TTCTTCCCAAATTTCGATTCA-3'	NM_001081849.1
<i>CD36</i>	F 5'-GGTCTACGCCGTGTTTGGAG-3' R 5'-CCGTGCAGAAGCAGTGGTTA-3'	<a href="#">XM_005609038.1</a>
<i>LPL</i>	F 5'-AGTTGGGTGCCAAAAGTGTG-3' R 5'-GCTTGGTGTACCCCGCAGAC-3'	XM_001489577.2
<i>VEGFα</i>	F 5'-TACCTCCACCATGCCAAGTG-3' R 5'-GTCTCGATTGGACGGCAGTA-3'	<a href="#">NM_001081821.1</a>
<i>Flt1</i>	F 5'-AGTGTGAGCGGCTCCCTTATG-3' R 5'-ATGCCAAATGCAGATGCTTG-3'	XM_003363176.1
<i>KDR</i>	F 5'-CAGTGGGCTGATGACCAAGA-3' R 5'-TCCACCGAAGATTCCATGCC-3'	XM_001916946.2
<i>eNOS</i>	F 5'-TTCGGGAGAGTGAGCTGGTA-3' R 5'-CAATCCCGCGCATCAAAGAC-3'	XM_001504650.3
<b>Reference gene</b>	<b>Forward and reverse primers</b>	<b>Accession number</b>
<i>GAPDH</i>	F 5'-CGATGGTGAAGGTCGGAGTAA-3' R 5'-TGAAGGGGTCATTGATGGCG-3'	NM_001163856.1
<i>RPL32</i>	F 5'-TGAAGTGCTGCTCATGTGCA-3' R 5'-GGGATTGGTGATTCTGATGGC-3'	ENSECAG00000007201
<i>SCAMP3</i>	F 5'-CTGTGCTGGGAATTGTGATG-3' R 5'-ATTCTTGCTGGGCCTTCTG-3'	[26]

**TABLE 2.** Number of pregnancies with median age and withers height, primiparity/multiparity and sex ratio within the six groups. P-P: Pony-in-Pony; P-D: Pony-in-Draft; S-P: Saddlebred-in-Pony; S-S: Saddlebred-in-Saddlebred; S-D: Saddlebred-in-Draft; D-D: Draft-in-Draft.

Groups	Mares and recipient mares				Pregnancies			Foals	
	Age (years)	Withers height (cm)	% primiparous	% multiparous	Foalings 2011	Foalings 2012	Foalings total	♂	♀
<b>P-P</b>	9.0 [5.1-10.1]	126.5 [121.0-129.5]	57	43	10	11	21	9	12
<b>P-D</b>	4.5 [3.8-6.0]	157.5 [150.5-162.0]	67	33	5	1	6	2	4
<b>S-P</b>	8.6 [4.6-9.3]	132.5 [129.8-136.0]	83	17	4	2	6	4	2
<b>S-S</b>	7.2 [4.3-13.0]	159.5 [156.0-163.5]	32	68	18	10	28	12	16
<b>S-D</b>	3.7 [3.3-4.2]	158.0 [154.3-160.5]	75	25	8	0	8	2	6
<b>D-D</b>	5.2 [4.2-5.3]	155.5 [158.0-159.8]	38	63	0	8	8	5	3



**TABLE 3.** Calibrated normalized relative quantity (CNRQ) for differentially expressed genes within the 6 groups of placentas. P-P (n=19): Pony-in-Pony; P-D (n=4): Pony-in-Draft; S-P (n=6): Saddlebred-in-Pony; S-S (n=21): Saddlebred-in-Saddlebred; S-D (n=8): Saddlebred-in-Draft; D-D (n=8): Draft-in-Draft. (ANOVA using permutation tests followed by pairwise comparison tests,  $p < 0.05$ ).

Gene	CNRQ						Group significant effects		
	PP	PD	SP	SS	SD	DD	Differing groups	P-value	Coefficient
<i>IGF2</i>	0.70	0.74	0.55	1.04	0.86	1.41	PP vs SS	0.010	x1.49
	[0.60-0.92]	[0.56-0.95]	[0.34-0.66]	[0.67-1.38]	[0.65-1.12]	[0.96-2.02]	PP vs DD	0.006	x2.01
							SS vs DD	0.055	x1.36
							SP vs SS	0.009	x1.89
							SP vs SD	0.050	x1.56
<i>IGF1R</i>	0.59	0.56	0.63	0.93	0.65	0.94	PP vs SS	0.006	x1.58
	[0.48-0.78]	[0.47-0.68]	[0.37-0.74]	[0.61-1.47]	[0.44-1.30]	[0.69-1.30]	PP vs DD	0.006	x1.59
<i>IGF2R</i>	0.62	0.65	0.61	0.97	0.82	0.88	PP vs SS	0.003	x1.56
	[0.53-0.66]	[0.55-1.14]	[0.41-0.68]	[0.68-1.31]	[0.62-1.14]	[0.70-1.33]	PP vs DD	0.006	x1.42
<i>TGFβ1</i>	0.53	0.72	1.23	1.50	0.71	0.61	PP vs SS	0.003	x2.83
	[0.42-0.76]	[0.26-1.12]	[0.80-2.30]	[0.96-2.20]	[0.63-2.03]	[0.34-0.93]	DD vs SS	0.018	x2.46
<i>SLC2A1</i>	0.69	0.59	0.68	0.95	0.86	0.80	PP vs SS	0.003	x1.38
	[0.61-0.75]	[0.57-1.63]	[0.57-0.75]	[0.80-1.19]	[0.66-1.30]	[0.67-1.06]			
<i>SLC38A2</i>	0.58	0.64	0.58	1.01	0.55	0.67	PP vs SS	0.011	x1.74
	[0.54-0.66]	[0.56-1.67]	[0.46-0.65]	[0.55-1.40]	[0.49-0.91]	[0.64-0.98]	SP vs SS	0.021	x1.74
<i>LPL</i>	0.66	0.78	0.77	1.08	0.69	0.76	PP vs SS	0.006	x1.64
	[0.53-0.74]	[0.74-0.82]	[0.59-0.88]	[0.67-1.40]	[0.50-0.95]	[0.63-0.87]			
<i>KDR</i>	0.69	0.57	0.65	0.71	0.93	1.27	PP vs DD	0.003	x1.84
	[0.58-0.80]	[0.46-1.13]	[0.55-0.81]	[0.55-0.98]	[0.75-1.29]	[0.95-1.75]	SS vs DD	0.003	x1.79

FIGURE 1

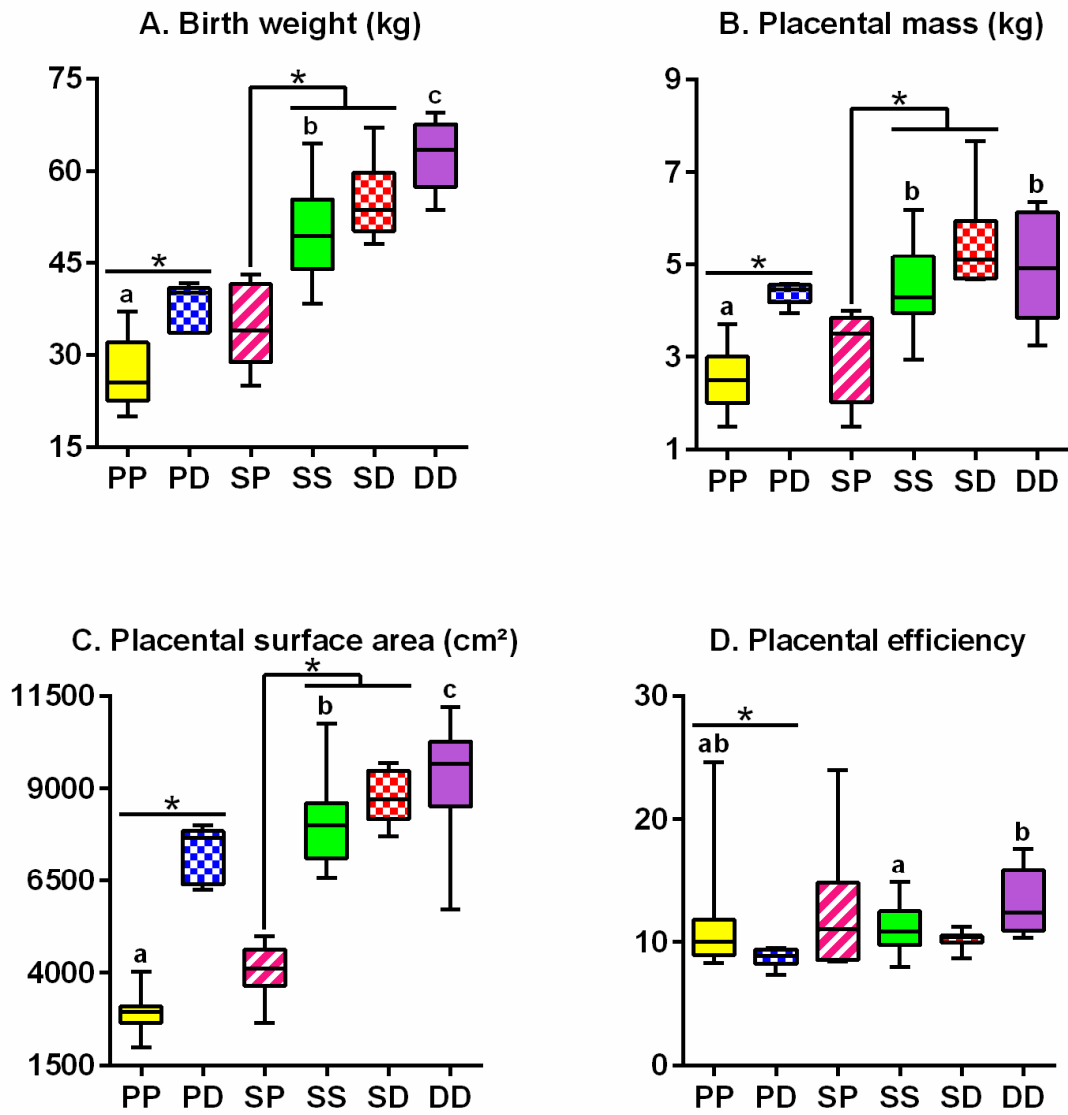
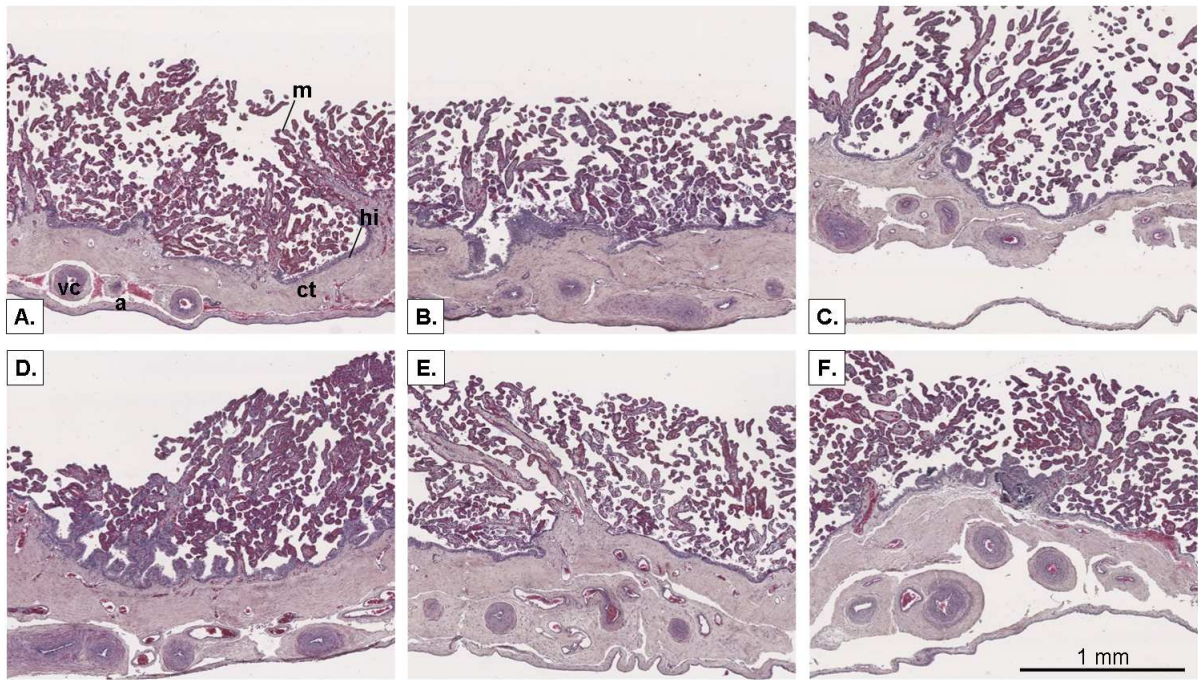
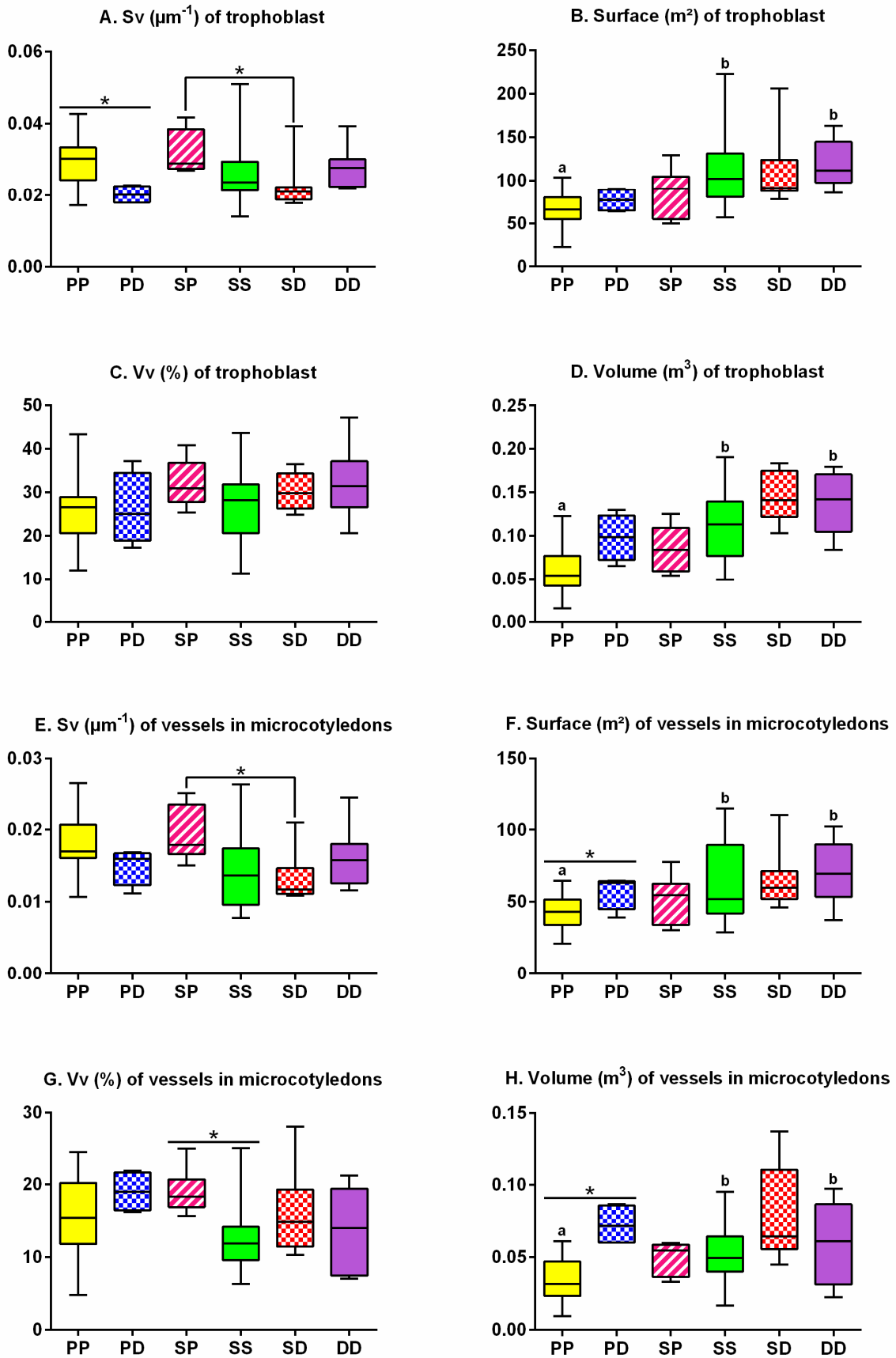


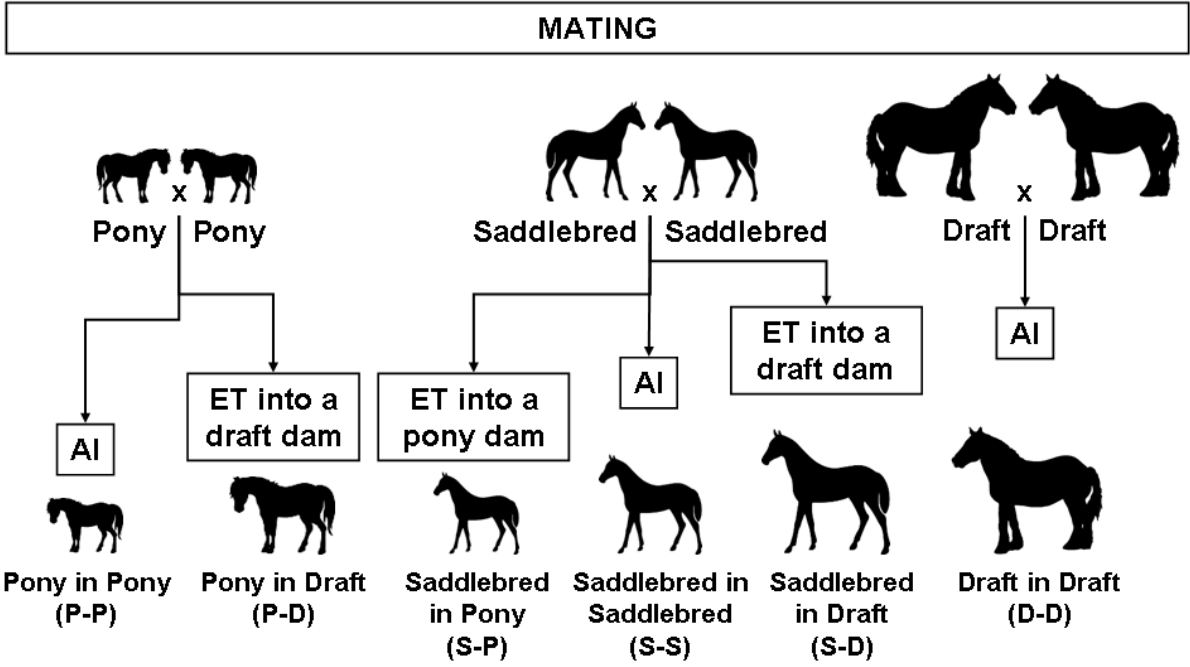
FIGURE 2



**FIGURE 3**



**SUPPLEMENTARY FIGURE 1.** Establishment of control and experimental pregnancies by artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET), respectively.



**SUPPLEMENTARY TABLE 1.** Nutritional value of the diets on farms 1 and 2.

<b>FARM 1 IN NOUZILLY</b>					
<b>PREGNANT AND LACTATING PONY MARES</b>					
	<b>DM (kg)</b>	<b>UF C</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UF C</b>	<b>MADC/UF C</b>
<b>Ovulation to gestational month 5</b>	Pasture				
<b>Gestational months 5 to 8</b>	5,23	2,3	158,51	2,28	69,16
<b>Gestational month 9</b>	5,30	2,9	208,00	1,83	71,72
<b>Gestational month 10</b>	4,50	2,8	169,22	1,58	59,48
<b>Gestational month 11</b>	4,50	2,8	169,00	1,61	60,36
<b>First 10 days after foaling (P-P mares in 2011 and 2012 and S-P mares in 2012)</b>	10,11	6,4	459,03	1,59	72,01
<b>First 2 months after foaling (S-P mares in 2011)</b>	9,00	5,4	489,00	1,66	90,01
<b>Until weaning at age 6 months</b>	Pasture				
<b>POST-WEANING P-P and S-P FOALS</b>					
	<b>DM (kg)</b>	<b>UF C</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UF C</b>	<b>MADC/UF C</b>
<b>Age 7 to 12 months (P-P foals born in 2011 and 2012)</b>	3,90	2,8	228,00	1,41	81,99
<b>Age 6 months (S-P foals born in 2011)</b>	4,90	2,5	129,61	1,99	52,76
<b>Age 7 months (S-P foals born in 2011)</b>	4,90	3,3	358,00	1,50	109,25
<b>Age 7 to 8 months (S-P foals born in 2012)</b>	5,30	4,4	446,91	1,21	101,77

**FARM 2 IN CHAMBERET**

<b>PREGNANT AND LACTATING SADDLEBRED MARES</b>	<b>DM (kg)</b>	<b>UF C</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UF C</b>	<b>MADC/UF C</b>
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational month 5	8,29	5,9	344,5	1,42	58,89
Gestational month 6	9,70	7,3	448,0	1,33	61,37
Gestational month 7	9,80	8,3	497,0	1,18	59,88
Gestational month 8	9,10	7,3	463,6	1,24	63,23
Gestational months 9 and 10	9,50	7,1	601,0	1,34	84,65
Gestational month 11	9,1	6,7	540	1,36	80,60
First 3 days after foaling	15,4	12,5	1364,5	1,23	109,16
Until weaning at age 6 months	Pasture				

<b>PREGNANT AND LACTATING DRAFT MARES</b>	<b>DM (kg)</b>	<b>UF C</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UF C</b>	<b>MADC/UF C</b>
Ovulation to gestational month 5	Pasture				
Gestational month 5	7,60	5,8	440,00	1,31	75,86
Gestational month 6	9,00	7,1	446,50	1,28	63,33
Gestational month 7	9,80	8,3	497,00	1,18	59,88
Gestational month 8	9,60	7,3	456,00	1,32	62,47
Gestational months 9 and 10	8,60	8,4	732,00	1,02	87,14
Gestational month 11	10,6	8,5	622	1,25	73,14
First 3 days after foaling	14,7	10,9	976	1,35	89,54
Until weaning at age 6 months	Pasture				

<b>POST-WEANING P-D FOALS</b>	<b>DM (kg)</b>	<b>UF C</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UF C</b>	<b>MADC/UF C</b>
Age 7 to 12 months (P-D born in 2011)	3,05	1,5	143,00	2,09	97,95
Age 7 and 8 months (P-D born in 2012)	?	1,9	208,73	?	?

<b>POST-WEANING S-S AND S-D FOALS</b>	<b>DM (kg)</b>	<b>UF C</b>	<b>MADC (g)</b>	<b>DM/UF C</b>	<b>MADC/UF C</b>
Age 6 to 12 months (S-S and S-D born in 2011)	3,05	1,5	143,00	2,09	97,95
Age 6 to 12 months (S-S born in 2012)	4,93	1,9	208,73	2,57	108,71

## **2.6. Article: “Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status in pre-weaning horses”**

**Peugnet P**, Robles M, Mendoza L, Wimel L, Dubois C, Dahirel M, Guillaume D, Camous S, Berthelot V, Toquet MP, Richard E, Sandersen C, Chaffaux S, Lejeune JP, Tarrade A, Serteyn D, Chavatte-Palmer P

*Article soumis à PLoS ONE le 13 octobre 2014.*





**Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre-weaning horses**

Pauline Peugnet<sup>1\*</sup>, Morgane Robles<sup>1</sup>, Luis Mendoza<sup>6</sup>, Laurence Wime<sup>2</sup>, Cédric Dubois<sup>2</sup>, Michèle Dahirel<sup>1</sup>, Daniel Guillaume<sup>3</sup>, Sylvaine Camous<sup>1</sup>, Valérie Berthelot<sup>4</sup>, Marie-Pierre Toquet<sup>5</sup>, Eric Richard<sup>5</sup>, Charlotte Sandersen<sup>6</sup>, Stéphane Chaffaux<sup>1</sup>, Jean-Philippe Lejeune<sup>6</sup>, Anne Tarrade<sup>1</sup>, Didier Serteyn<sup>6</sup>, Pascale Chavatte-Palmer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy en Josas, France;

<sup>2</sup>IFCE, Station Expérimentale de la Valade, F-19370 Chamberet, France; <sup>3</sup>INRA, UMR85, Physiologie de la Reproduction et Comportements, CNRS, UMR7247, F-37380 Nouzilly, France; Université

François Rabelais de Tours, F-37000 Tours, France; <sup>4</sup>AgroParis Tech, F-75005 Paris, France;

<sup>5</sup>Normandie University, UNICAEN, SF4206 ICORE / LABEO Frank Duncombe Laboratory, F-14000

Caen, France; <sup>6</sup>Clinique Equine, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgium

**\*Corresponding author:** Pauline Peugnet / INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction - Bâtiment 230 - Domaine de Vilvert - F-78350 Jouy en Josas - France / peugnetpauline@gmail.com / + 33134652558

## ABSTRACT

In stud management, broodmares are commonly fed concentrates in late pregnancy. This practice, however, was shown to correlate with an increased incidence of osteochondrosis in foals, which may be related to insulin sensitivity. Here, pregnant multiparous saddlebred mares were fed fodder only (group F, n=13) or both fodder and cracked barley (group B, n=12) from the 7<sup>th</sup> month of pregnancy until term, as calculated to cover nutritional needs of broodmares. Diets were given in two daily meals. All mares and foals returned to pasture after parturition. Post-natal growth, glucose metabolism and osteoarticular status were investigated in pre-weaning foals. B mares maintained an optimal body condition score (>3.5), whereas that of F mares decreased and remained low (<2.5) up to 3 months of lactation, with a significantly lower bodyweight (-7%) than B mares throughout the last 2 months of pregnancy. B mares had increased plasma glucose and insulin after the first meal and after the second meal to a lesser extent, which was not observed in F mares. B mares also had increased insulin secretion during an intravenous glucose tolerance test (IVGTT). Plasma NEFA and leptin were only slightly affected by diet in mares during pregnancy or in early lactation. Neonatal B foals had increased serum osteocalcin and slightly increased glucose increments and clearance after glucose injection, but these effects had vanished at weaning. Body measurements, plasma IGF-1, T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, NEFA and leptin concentrations, insulin secretion during IVGTT, as well as glucose metabolism rate during euglycemic hyperinsulinemic clamps after weaning, did not differ between groups. Radiographic examination of joints indicated increased osteochondrosis relative risk in B foals, but this was not significant. These data demonstrate that B or F maternal nutrition has very few effects on foal growth, endocrinology and glucose homeostasis until weaning, but may induce cartilage lesions.

## INTRODUCTION

Epidemiological observations in humans have linked early-life events with a range of degenerative pathologies in adulthood. Individuals with small birth weight are at greater risk of developing coronary heart disease, hypertension, type II diabetes or osteoporosis in later life [1]. Because fetal growth is primarily determined by the nutrient supply, studies of the Developmental Origins of Health and Disease have first focused on maternal undernutrition and nutritional deficiencies. Indeed, individuals who were exposed *in utero* to the Dutch Famine were more susceptible to develop metabolic syndrome in adult life [2]. The concept was extended to all forms of malnutrition, since higher risk to develop diseases as an adult was found in both individuals born small and individuals born large, with a U-shaped curve [3,4].

Developmental programming of the offspring by maternal nutritional imbalance has been investigated experimentally in mammals using various models aimed at compromising the fetal nutrient supply [5]. In horses, there is a growing body of evidence indicating immediate and long term post-natal consequences of fetal adaptations to intra-uterine *stimuli*. Experimental models of lush *versus* deprived fetal nutrient supply have been obtained by transferring embryos from small ponies into large Thoroughbred, saddlebred and draft mares and conversely. Growth patterns were altered up to three years of age [6-8]. Glucose homeostasis, as well as thyroid hormones concentrations, was affected until weaning [8,9].

The effect of maternal nutrition was partly investigated by Ousey and her colleagues: feeding pregnant mares with moderate *versus* high amounts of concentrates throughout pregnancy did not affect birth weight, but enhanced pancreatic  $\beta$  cell sensitivity to glucose in newborns born to mares in the moderate group [10]. Besides, feeding pregnant dams with a high starch diet from the 7<sup>th</sup> month of pregnancy induced a trend towards lower insulin sensitivity in foals at 160 days of age [11]. Recently, an epidemiological study demonstrated that foals born to dams supplemented with concentrates during pregnancy had an increased incidence of osteochondrosis lesions compared to those born to dams that were not supplemented [12].

In practice, broodmares are often fed high energy rations in late pregnancy *i.e.*, at the time of maximal fetal growth, which may have detrimental effects in the newborn but also in the adult horse. The present study investigates the effects of adding a limited amount of carbohydrates-concentrated

feed to the diet of broodmares on their foals' post-natal growth, glucose metabolism and joint health. Cracked barley was chosen as a concentrate in order to provide additional energy to mares for the last four months of pregnancy and because it is commonly used in stud management. Foals were monitored from birth to weaning for growth, glucose homeostasis, endocrine factors involved in both growth and energy regulation (Insulin-like Growth Factor-I, IGF-I; thyroid hormones, T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub>), as well as biomarkers of bone cell activity during growth (osteocalcin; hydroxyproline; C-telopeptide of type II collagen, CTX-II).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Animal studies received ethical approval from the local ethics committee ("Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale du Limousin") under protocol number 5-2013-5.

### ***Mares and establishment of pregnancies***

Twenty-five mares (Selle Français, Anglo-Arab and Saddlebred) were used (median age: 9 years; range 6 to 21). They were raised in the "Institut Français du Cheval et de l'Équitation" experimental farm (Chamberet, France, 45°34'55.17" N, 1°43'16.29"E, 442 m). All mares were multiparous (median parity: 3; range 2 to 11 foals). Twenty-five pregnancies were obtained by artificial insemination (from May 9<sup>th</sup> to June 29<sup>th</sup>) using semen from one saddlebred stallion.

### ***Management and feeding of mares and foals***

From ovulation, grazing was available 24 h/day with free access to water and mineral salts. Pregnant mares were conducted in one same herd. From November 21<sup>st</sup> (median gestational day 186; range 145 to 196), they were moved to individual boxes in the same barn. They were fed hay and haylage until December 5<sup>th</sup> (median gestational day 200, range 159 to 210), when they were allocated to a "fodder" (group F, n=13) or "barley" (group B, n=12) feeding group, with equal repartition between groups according to age, parity and withers' height (Table 1). Group F was fed hay and haylage, whereas group B was fed hay, haylage and a homemade mix of cracked barley with vitamins and

minerals (Excel Prima S<sup>®</sup>, Chauveau Nutrition, Cholet, France). Group F received vitamins and minerals simultaneously to concentrates distribution in group B. Diets were distributed in two daily meals (8:45 AM and 3:45 PM), with free access to water. Dietary offer was adjusted according to mares' bodyweight at median gestational days 208, 221, 241, 272, 282, 304, 321 and 332, in accordance with current recommendations for broodmares [13]. A different hay batch was used near parturition because the batch used at the start of the experiment was out of stock. The quality of feedstuff was measured (Table 2). The daily quantity of feeds given to mares according to gestational age is shown in Table 3.

All foals were born during spring (from April 8<sup>th</sup> to June 3<sup>rd</sup>). Mares and foals returned to grazing 3 days after foaling. Fillies and colts were raised in one group in the same pasture until weaning at 180 days of age by complete, abrupt separation of mares and foals. Foals were then housed in open barns, fed hay twice a day and complemented individually (using an automatic concentrates feeder) with homemade pellets containing barley, soybean cake, molasses and vitamins and minerals (Excel Prima S<sup>®</sup>, Chauveau Nutrition, Cholet, France) in agreement with current recommendations for growing foals [13], with free access to water. The daily nutritional supply to weanlings is given in Table 4. Foals were dewormed at median age 142 days (range 105 to 161).

### ***Body measurements and blood sampling in mares and foals***

Mares were weighed and their body condition score (BCS - scale 1 to 5 [14]) was estimated by two trained, independent operators monthly during pregnancy, in the 1<sup>st</sup> day, the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> month of lactation. Jugular vein blood samples were collected on EDTA tubes monthly during pregnancy, in the 1<sup>st</sup> day, the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> month of lactation between 9:00 AM and 10:00 AM to measure plasma concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA) which reflect the mobilization of body fat in case of energy deficit and leptin which are a proxy for adiposity.

Foals were weighed and measured for withers' height, front leg length, chest circumference, shoulder and hip widths in the morning following birth and then monthly until weaning at 180 days of age. Jugular vein blood samples were collected on EDTA and serum tubes before first suckling, at 3 and 30 days of age after 4 h fasting, at 60 and 90 days of age after 6 h fasting and at 180 days of age after overnight fasting to measure plasma concentrations of IGF-1, T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> which are essential factors of bone longitudinal growth through enchondral ossification, as well as serum concentrations of

osteocalcin, hydroxyproline and CTX-II which are biomarkers of bone and cartilage turn-over. Fasting glucose concentrations were measured at 3, 30, 90, 130, 180 and 210 days of age using an automated analyzer (Medisense Optium Xceed<sup>®</sup>, Abbott, Illinois, USA). Plasma or serum was separated after centrifugation and stored at -20°C.

### **Glucose metabolism testing in mares and foals**

#### ***Assessment of the daily effect of diet on plasma glucose and insulin***

Jugular vein blood samples were collected each hour over a 10-hour period on December 17<sup>th</sup> (median gestational day 212; range 171 to 223), starting at 8:30 AM and ending at 6:30 PM, for immediate measurement of plasma glucose concentrations using an automated analyzer. Plasma was separated after centrifugation and stored at -20°C.

#### ***Intravenous glucose tolerance test (IVGTT) in mares and foals***

IVGTT were performed in mares in August (before dietary treatment, at median gestational age 96; range 53 to 107) and in February (after the start of the dietary treatment, at median gestational age 276; range 237 to 286), as well as in foals at median ages 3 and 130 days (range 125 to 138). The procedure and calculations were previously described [8].

Food was withheld from mares the evening before the procedure, whereas foals were muzzled to prevent suckling 4 h (at 3 days of age) and 6 h (at 130 days of age) before the procedure. Animals were intravenously infused with glucose (0.25 g/kg, 30% glucose) over 5 min in mares, 1 min in 3-day old foals and 2 min in 130-day old foals. Jugular vein blood samples were collected on EDTA tubes in mares at -5 min and 5, 7, 9, 12, 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min after the injection started, in 3-day old foals at -5 min and 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30 and 60 min after the injection started and in 130-day old foals at -5 min and 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 30, 60 and 120 min after the injection started.

#### ***Hyperinsulinemic euglycemic clamp in foals***

Hyperinsulinemic euglycemic clamps were performed in foals at median age 210 days (range 202 to 216). The procedure and calculations were previously described [8].

## **Biochemical analyses**

### ***Plasma NEFA analysis***

Plasma NEFA concentrations were measured in mares and foals in duplicate with an enzymatic-colorimetric method using a Cobas Mira-analyzer with a commercial kit (Roche, Mannheim, Germany) as previously described [8]. The minimum level of detection was 10  $\mu\text{mol/L}$ . Intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.7% and 4.5%, respectively.

### ***Plasma leptin analysis***

Plasma leptin concentrations were measured in mares and foals in duplicate with a homologous double-antibody RIA as previously described [8,15]. The limit of detection was 1.0 ng/ml. The intra-assay coefficient of variation was less than 10%.

### ***Plasma insulin analysis***

Plasma insulin concentrations during glucose metabolism tests were measured in duplicate with a double antibody RIA as previously described [8,15]. The minimum level of detection was 0.1 pg/mL. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.2% and 5.8%, respectively.

### ***Plasma IGF-1, T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> analyses***

Plasma IGF-1, T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> concentrations were measured in foals in duplicate with commercial RIA kits (CISbio International, Gif-sur-Yvette, France) as previously described [8,15]. The minimum levels of detection were 1.0 ng/mL, 2.5 ng/mL and 0.1 ng/mL, respectively for plasma IGF-1, T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub>. Intra- and inter-assay coefficients of variation were respectively 3.5% and 6.0% for plasma IGF-1, 4.7% and 8.0% for plasma T<sub>4</sub> and 7.8% and 8.2% for plasma T<sub>3</sub>.

### ***Serum osteocalcin, hydroxyproline and CTX-II analyses***

Serum osteocalcin and CTX-II were assayed in foals in simple with commercial ELISA kits (Immunodiagnostic Systems, Paris, France) validated for use in the horse in the Frank Duncombe Departmental Laboratory. Photometric measurements were set at a wavelength of 450 nm. The minimum levels of detection were 0.5 ng/mL and 3.7 pg/mL, respectively for osteocalcin and CTX-II.



Intra- and inter-assay coefficients of variation were respectively 4.0% and 1.8% for osteocalcin and 4.8% and 2.4% for CTX-II. Serum hydroxyproline concentrations were measured in foals in simple with a colorimetric assay as previously described [16,17]. Photometric measurements were set at a wavelength of 558 nm.

### **Radiographic evaluation of osteoarticular status in foals**

Radiographic examination at median age 218 days (range 183 to 239) was performed according to a previously reported procedure [12]. Foals were sedated using romifidine (0.06 mg/kg intravenous of Sedivet, Boehringer Ingelheim, Belgium) alone or combined with butorphanol (0.02 mg/kg intravenous of Dolorex, Intervet/Schering Plough, Belgium) when needed. Two experimented examiners analyzed individually the digital radiographs, using the method of radiographic interpretation previously described [18]. Foals were classified as OC-positive according to the presence of one or more OC lesions identified by both examiners. OC was diagnosed according to the presence of lesions that were previously described [12,19].

### **Statistical analyses**

Results are expressed as median [quartile 1 - quartile 3] and presented as curves (median and interquartile range IQR) or boxplots (minimum to maximum). Statistical analyses were carried out using R software ([www.r-project.org/](http://www.r-project.org/), version 2.15.2).

In mares, repeated measures were divided in three periods (pregnancy before diet, pregnancy during dietary treatment and lactation) and were analyzed in each period by non-parametric ANOVA using the F1-LD-F1 model of the nparLD function [20], taking into account the diet and time. If the dietary effect or diet:time interaction were significant, B and F mares were compared using the Mann-Whitney test at each time point. P-values from the Mann-Whitney tests were adjusted using the FDR (Benjamini-Hochberg) method.

In foals, repeated measures were analyzed using the F2-LD-F1 model of the nparLD function, taking into account the diet, sex and time [20]. If the diet effect, diet:time interaction, sex effect or sex:time interaction were significant, B and F foals, as well as fillies and colts, were compared using

the Mann-Whitney test at each time point. P-values from the Mann-Whitney tests were adjusted using the FDR (Benjamini-Hochberg) method. Non-repeated measures were analyzed using the Mann - Whitney test with no adjustment.

Effects were considered significant for p-values<0.05. For repeated measures, p-values in the text are those from the F1-LD-F1 and F2-LD-F1 tests, whereas asterisks in the figures indicate adjusted p-values<0.05 from the Mann-Whitney tests. For non-repeated measures, p-values in the text are those from the Mann-Whitney tests.

Relative risks and odds ratios related to osteochondrosis presence or absence were calculated using MedCalc software (<http://www.medcalc.org/>, v13.3.3) and analyzed using chi-squared tests. They were considered significant for p-values<0.05

## RESULTS

### Nutritional offer to mares

Figure 1 presents the nutritional offer to mares according to gestational age. It differed significantly between both diets for net energy (NE, expressed in horse feed units, p<0.001), horse digestible crude proteins (HDCP, p=0.007), raw cellulose (RC, p<0.001) and calcium to phosphorus ratio (Ca/P, p<0.001), with significant diet:time interactions (p<0.001 for the four parameters).

The NE offer was significantly higher in B *versus* F mares from gestational days 200 to 321 and similar between both groups from gestational day 321 to parturition. Diet B provided up to 59.9% more NE than diet F from gestational days 241 to 272.

The HDCP offer was significantly higher in B *versus* F mares from gestational days 200 to 304. It was similar between both groups from gestational days 304 to 321, after which the HDCP supply was significantly lower in B *versus* F mares until parturition. Diet B provided up to 89.2% more HDCP than diet F from gestational days 241 and 272 and up to 14.6% less HDCP than diet F from gestational day 321 to parturition.

The RC and Ca/P offers were significantly lower in B *versus* F mares from gestational days 200 to parturition. Diet B provided up to 39.8% less RC from gestational day 321 to parturition.

## **Effects of diets in mares**

### ***Pregnancy and parturition outcomes***

Twenty-five pregnancies were obtained that were allocated to group F (n=13) and group B (n=12). All mares delivered spontaneously within the normal pregnancy length (range 331 to 356 days). One B foal with abnormal presentation caused dystocia in the mare and died. Pregnancy data relative to this mare were not discarded from further analysis. Twenty-four healthy foals were obtained (n=13 in group F; n=11 in group B): 7 fillies/6 colts in group F and 5 fillies/6 colts in group B. One F mare died and her colt was weaned at 150 days of age. Another F colt died around 150 days of age from septicemia. All other foals were weaned at 180 days of age.

### ***Bodyweight and BCS in mares***

Figure 2 presents mares' bodyweights and BCS. Statistical analyses of BCS were performed from the 2<sup>nd</sup> month of pregnancy.

From gestational days 0 to 195, bodyweights were similar between both groups, but varied significantly with time ( $p < 0.001$ ). From gestational days 210 to 315, a significant dietary effect ( $p = 0.016$ ) and time effect ( $p < 0.001$ ) were observed on bodyweights, with a significant diet:time interaction ( $p = 0.009$ ). F mares were significantly lighter than B mares on gestational days 270 (-6.1%), 285 (-6.2%), 300 (-8.0%) and 315 (-8.5%). From suckling days 1 to 180, a significant time effect ( $p < 0.001$ ) and diet:time interaction ( $p = 0.034$ ) were observed on bodyweights, whereas the dietary effect tended to be significant ( $p = 0.067$ ). F mares tended to be lighter than B mares on suckling days 1, 15, 30 and 60.

From gestational days 45 to 195, BCS were similar between both groups, but varied significantly with time ( $p < 0.001$ ). From gestational days 225 to 315, no time effect was observed, but BCS were significantly affected by diet ( $p < 0.001$ ), with a significant diet:time interaction ( $p = 0.007$ ). F mares had significantly lower BCS on gestational days 225, 255, 285 and 315. From suckling days 30 to 180, a significant dietary effect ( $p < 0.001$ ), time effect ( $p < 0.001$ ) and diet:time interaction ( $p < 0.001$ ) were observed. F mares had significantly lower BCS on suckling days 30, 60 and 90.

### ***Glucose homeostasis in mares***

The effect of maternal diet and meal time on daily glucose and insulin concentrations was studied. Data are shown in Figure 3. Plasma glucose concentrations varied significantly with diet ( $p < 0.001$ ) and time of the day ( $p < 0.001$ ) with a significant diet:time interaction ( $p < 0.001$ ). B mares had significantly higher plasma glucose concentrations at 8:30 AM, 10:30 AM, 2:30 PM, 3:30 PM, 4:30 PM, 5:30 PM and 6:30 PM than F mares. Plasma insulin concentrations varied significantly with diet ( $p = 0.013$ ) and time of the day ( $p < 0.001$ ) with a significant diet:time interaction ( $p = 0.015$ ). B mares had significantly higher plasma insulin concentrations at 10:30 AM and tended to have higher concentrations at 9:30 AM, 11:30 AM, 2:30 PM and 5:30 PM.

IVGTT were performed before and after the dietary treatment started. Data are shown in Figure 4. No difference between groups was observed in August. Plasma glucose increments, AUC and maximal increment during IVGTT in February were unaffected by diet. Plasma insulin increments, however, were significantly higher in B *versus* F mares at 7, 12, 15, 30, 60 and 90 min after the injection started ( $p = 0.002$  for the dietary effect). Plasma insulin AUC was significantly increased in B *versus* F mares ( $p = 0.009$ ), and the maximal plasma insulin increment tended to be significantly higher in B *versus* F mares ( $p = 0.057$ ).

### ***Plasma NEFA and leptin in mares***

Figure 5 presents mares' plasma NEFA and leptin concentrations. Statistical analyses of both parameters were performed from the 2<sup>nd</sup> month of pregnancy.

From gestational days 45 to 195, plasma NEFA concentrations were similar between both groups but varied significantly with time ( $p < 0.001$ ). From gestational days 225 to 315, a significant dietary effect ( $p = 0.007$ ) and time effect ( $p < 0.001$ ) were observed on plasma NEFA concentrations. F mares had higher plasma NEFA concentrations than B mares on gestational days 225 and 315. Throughout suckling, plasma NEFA concentrations varied significantly only with time ( $p < 0.001$ ).

From gestational days 45 to 195, plasma leptin concentrations were similar between both groups but varied significantly with time ( $p < 0.001$ ). From gestational days 225 to 315, no significant dietary or time effect was observed. Throughout suckling, plasma leptin concentrations varied significantly with time ( $p = 0.019$ ) and the dietary effect and diet:time interaction tended to be significant ( $p = 0.089$  and  $p = 0.090$ ). F mares tended to have lower plasma leptin concentrations on suckling day 1.

## **Effects of diets in foals**

### ***Body measurements in foals***

Table 5 presents foals' bodyweight, withers' height and chest circumference at 1 and 180 days of age. All body measurements increased significantly with age ( $p < 0.001$ ) without any significant dietary or sex effect. Daily weight gain remained unchanged by diet or sex.

### ***Glucose homeostasis in foals***

Fasting glycemia decreased significantly as foals became older ( $p < 0.001$ ), reached a nadir at 90 days of age and remained stable thereafter. Fasting glycemia was unaffected by diet or sex.

Table 5 presents data from glucose metabolism testing. During IVGTT at 3 days of age, plasma glucose concentrations peaked 3 min after the start of the glucose injection. Plasma glucose increments were significantly affected by diet ( $p = 0.012$ ), tended to be higher 3 min post-injection and were significantly higher 5 min post-injection in F *versus* B foals. Plasma glucose AUC tended to be higher in F *versus* B foals ( $p = 0.087$ ) and maximal increments were unaffected by diet. Plasma insulin concentrations peaked 5 min after the glucose injection started. Plasma insulin increments, AUC and maximal increments were unaffected by diet. During IVGTT at 130 days of age, plasma glucose and insulin increments were not affected by diet anymore. No sex effect was observed at both ages.

No dietary effect was observed on glucose metabolism rates during hyperinsulinemic euglycemic clamps at 210 days of age. Fillies, however, had a significantly higher glucose metabolism rate than colts ( $p = 0.042$ ).

### ***Plasma NEFA and leptin in foals***

Table 5 presents foals' plasma NEFA concentrations at 3 and 180 days and plasma leptin concentrations at 180 days. No effect of age, diet or sex was observed on both parameters.

### ***Plasma IGF-1, $T_4$ and $T_3$ in foals***

Table 5 presents plasma IGF-1,  $T_4$  and  $T_3$  concentrations at 0 and 180 days of age. Plasma IGF-1 significantly increased whereas  $T_4$  and  $T_3$  concentrations significantly decreased as foals became older ( $p < 0.001$  for the three parameters), without any significant dietary effect. Plasma IGF-1

concentrations were subject to a significant sex effect ( $p=0.008$ ), with fillies having significantly lower plasma concentrations than colts at birth, 130 and 180 days of age. Plasma  $T_4$  and  $T_3$  concentrations were unaffected by sex.

### ***Serum osteocalcin, hydroxyproline and CTX-II***

Table 5 presents serum osteocalcin, hydroxyproline and CTX-II concentrations at 3 and 130 days. All three parameters decreased significantly as foals became older ( $p<0.001$  for all three parameters). Only serum osteocalcin concentrations tended to be affected by diet ( $p=0.054$ ) with a diet:time interaction ( $p=0.055$ ). F foals tended to have lower serum osteocalcin concentrations than B foals at 3 days of age. No sex effect was found on any of the three parameters.

### ***Osteochondrosis lesions***

Seven foals were osteochondrosis-positive at 218 days of age: 2 fillies in group F (16.7%) *versus* 5 foals (4 fillies and 1 colt) in group B (45.5%). Neither relative risks nor odds ratios differed between both groups (Table 6). Both affected foals of group F presented 2 osteochondrosis lesions, localized in the right hock and left stifle for one foal and in both hocks for the other foal. The five affected foals of group B presented only one osteochondrosis lesion, localized in one or the other of the hocks for 2 of them, localized in one or the other of the stifles for 2 other foals and in the left front fetlock for the last one.

## **DISCUSSION**

Cracked barley provided additional net energy and digestible proteins to mares from the 7<sup>th</sup> month of pregnancy. Barley containing meals induced a sharp peak of both glycemia and insulinemia in the morning, followed by a second rise of glycemia in the afternoon associated with a slight increase of insulinemia. Barley enabled mares to maintain optimal body condition throughout pregnancy and lactation and to gain bodyweight until parturition. On the opposite, mares fed fodder dramatically lost body condition until return to pasture and gained less bodyweight throughout pregnancy. They demonstrated energy deficit as shown by transient higher plasma NEFA concentrations during dietary

treatment. In the 9<sup>th</sup> month of pregnancy, insulin secretion in response to glucose injection was markedly lowered in mares fed fodder, with unaffected glucose clearance.

No difference was found in pregnancy length, foals' measurements or endocrine factors of growth from birth until weaning. F foals, however, tended to be more tolerant to glucose at 3 days of age, as demonstrated by amplified glucose response and slowed-down glucose clearance after injection, without any variation in insulin response. F foals also had lower osteocalcin concentrations at the same age. Those alterations were corrected at the time of weaning. Preliminary data on osteoarticular status shortly after weaning showed increased incidence of osteochondrosis lesions in foals born to dams fed barley but this was not significant.

B mares received more net energy (up to 59.9% more) and digestible proteins (up to 89.2% more) than F mares between the 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> month of pregnancy. Energy supply was similar between both groups thereafter, whereas F mares received more proteins than B mares. Hay batches given from the 10<sup>th</sup> month of pregnancy differed from that used from the 7<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> month of pregnancy by their nutritional properties, with higher energy, nitrogen, phosphorus and calcium contents. Energy provided by each diet differed by their amounts, but also by their nature: fodder provides mainly energy derived from volatile fatty acids, whereas barley provides energy derived from simple carbohydrates. Nitrogen concentrations in both diets did not exceed 100% of current INRA recommendations for broodmares [13]. Besides, the calcium to phosphorus ratio remained in a range from 1 to 3, as recommended to avoid calcium absorption defects and bone demineralization due to phosphorus excess, as well as magnesium and trace elements (manganese, zinc, iron, copper and iodine) absorption defects due to calcium excess [13]. On the opposite, B mares received lower amounts of fiber (up to 39.8% less) *i.e.*, less than 30% fiber whereas F mares received between 28% and 35% fiber. Fiber excess (>30%), however, is susceptible to limit digestibility of other compounds of the diet, as well as the feed intake necessary to cover nutritional requirements [13].

B mares maintained BCS higher than 3.5 until parturition which is considered optimal for future lactation. On the opposite, F mares' BCS fell below 2.5 until parturition which is considered insufficient [14]. F mares' BCS did not start to increase before the 2<sup>nd</sup> suckling month. This could have altered milk composition since reforming body stores prevails over lactation in mares. Indeed, in thin mares, close

to 30% of the energy intake enables stores deposit, whereas in fat mares, most energy is used for milk lipids synthesis [21]. Such a loss of body condition and such lower bodyweights were previously reported in Quarter Horse mares conducted in pasture (estimated to receive 100% of NRC digestible energy recommendations) *versus* mares conducted in pasture and supplemented with grain mix (120% of NRC digestible energy recommendations) in the last third of pregnancy. Light breed mares receiving low *versus* high starch isocaloric and isonitrogenous diets from the 7<sup>th</sup> month of pregnancy also lost body condition and presented lower bodyweights, even if to a lesser extent [11].

F mares presented a transient increase in plasma NEFA concentrations at the start and at the end of the dietary treatment compared to B mares. This suggests increased lipids mobilization in lean mares, as previously described in non-pregnant light breed mares in which digestible energy restriction increased by 2.5 plasma NEFA concentrations [22]. Plasma leptin concentrations, which are related to fat deposit and BCS in mares [23], were mainly unchanged between both diets. Only a tendency for lower plasma leptin concentrations was found in F mares on the 1<sup>st</sup> suckling day, although a decrease could also be expected before parturition as shown in mares conducted in pasture only [24] or fed a moderate energy diet [25]. Decreased plasma leptin concentrations are consistent with the lower BCS observed in our mares, but variations are so weak that they moderate potential increased lipids mobilization suggested above.

Plasma glucose and insulin concentrations in B mares peaked within 2 h after the 1<sup>st</sup> meal and only slightly increased after the 2<sup>nd</sup> meal, as was found in non-pregnant mares receiving various amounts of supplements of varying composition (mainly cracked corn, cottonseed hulls, corn gluten meal and molasses) [22]. Daily plasma glucose and insulin concentrations in response to feeding or fasting were in the same range as reported in non-pregnant mares [22], young geldings [26] and adult mares and stallions [27]. On the other side, energy and nitrogen restriction did not affect glucose clearance rate, but decreased insulin secretion during IVGTT in F mares in the 9<sup>th</sup> month of pregnancy. This is consistent with reports of unaffected glucose clearance rate but reduced insulin secretion during IVGTT in non-pregnant mares fed half energy and half protein requirements (both groups receiving concentrates). Frequently-sampled intravenous glucose tolerance test (FSIGT) in pregnant mares fed high *versus* low energy diets in the last trimester, however, did not evidence any



alteration in insulin sensitivity, glucose effectiveness or  $\beta$  cell responsiveness, nor in late pregnancy neither later in lactation [28]. But the authors repeated the experiment in order to increase variations in body condition between both groups (high BCS in the high energy fed group *versus* low BCS in the low energy fed group), so that they induced lower insulin sensitivity and lower acute insulin response to glucose in mares fed the low energy diet [29]. This diminished responsiveness of  $\beta$  cells is consistent with our results. This is surprising since insulin sensitivity is known to decline throughout pregnancy [30]. We could have expected amplified  $\beta$  cell secretion to compensate for the lower insulin-mediated glucose uptake. Such an inadequate  $\beta$  pancreatic function, together with severe insulin resistance reflects gestational diabetes mellitus in thin women [31], quite similarly to our low-BCS mares fed fodder only.

The diets that we used elicited different glucose and insulin responses in mares. Thus, fetal development could have been affected by barley supplementation. Pregnancy length and foals' body measurements at birth were similar between both groups. This is consistent with previous work inducing dietary metabolic variations in pregnant mares [10,11,24,32]. As discussed above, body condition of mares could have affected immunoglobulins concentrations in colostrum [32] or milk composition [21]. Milk data are not available at this time. Foals' growth, however, is used as an indirect marker of milk yield. Here, none of the foals' body measurements was affected by the dams' diet until weaning. These data are consistent with similar leptin concentrations at weaning, indicating similar fat deposit in both groups at this age. We were not able to measure foals' plasma leptin concentrations earlier in the suckling period but foals born to dams fed either a high or low energy diet were shown to have similar plasma leptin concentrations in the first two weeks [25]. In the same way, all foals had similar lipid mobilization as shown by similar plasma NEFA concentrations until weaning.

Here, fasting glucose concentrations from birth to weaning were independent from the mares' diet. Energy and nitrogen restriction in late pregnancy, however, slightly affected glucose tolerance of F foals in the immediate post-natal period. F foals had similar insulin secretion to B foals but slowed-down glucose clearance rate. This coincides with lower insulin sensitivity and glucose effectiveness observed during FSIGT in 2-week old foals born to dams fed a low energy diet [28]. We found that all effects on glucose and insulin homeostasis had vanished in F foals at weaning and again, this is

consistent with data from 4-month old foals born to dams fed a low energy diet [28]. Concomitantly, F foals tended to have lower serum osteocalcin concentrations. Osteocalcin is a hormone released by osteoblasts which stimulates  $\beta$  cell proliferation and expression of insulin-encoding genes in  $\beta$  cells [33]. Its action on adipocytes also increases adiponectine release, which improves tissues sensitivity to insulin by enhancing glucose uptake by cells [34]. This could be an explanation for a tendency for higher glucose tolerance in F foals.

It is established that cereals-rich rations of foals increase their predisposition to osteochondrosis [35-39], because they enhance postprandial glycemia and evoke a peak of insulinemia [40]. Insulin is involved in cartilage metabolism through the Growth Hormone, IGF-I [41] and thyroid hormones [42], reducing chondrocytes maturation and bone formation. To date, only one epidemiological study demonstrated an adverse effect of concentrates in the ration of the pregnant mare on the development of osteochondrosis in foals [12]. Here, radiographic examination showed that F foals were less affected by osteochondrosis than B foals in the immediate post-weaning period, even if not significant. These could be related to the lower serum osteocalcin concentrations observed in B foals earlier and would be consistent with previous report in foals with severe radiographic findings [17]. This is in favor of a deleterious impact of feeding pregnant mares with concentrates in late pregnancy on osteoarticular status in foals. But osteochondrosis is a dynamic pathology and most lesions are susceptible to have evolved at one year of age. Further examination is needed to confirm this observation.

In conclusion, our management of broodmares feeding elicits two different metabolic responses as regards energy balance and glucose homeostasis. Mares fed fodder seem to develop a syndrome close to gestational diabetes mellitus in women. This is worrying since it has been demonstrated to persist in the following pregnancy [43]. Few effects observed on foals' metabolism had disappeared at weaning, but other factors could have been affected and any events in later life could reveal new programming aspects by the plane of nutrition of pregnant mares.

## REFERENCES

1. Barker DJ (1990) The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 301: 1111.
2. Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP (2005) Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 20: 345-352.
3. Gluckman PD, Hanson MA (2004) Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin Fetal Neonatal Med* 9: 419-425.
4. Stettler N, Zemel BS, Kumanyika S, Stallings VA (2002) Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. *Pediatrics* 109: 194-199.
5. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L (2004) Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol* 561: 355-377.
6. Allen WR, Wilsher S, Stewart F, Stewart F, Ousey J, et al. (2002) The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. *J Endocrinol* 172: 237-246.
7. Allen WR, Wilsher S, Tiplady C, Butterfield RM (2004) The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction* 127: 67-77.
8. Peugnet P, Wimel L, Duchamp G, Sandersen C, Camous S, et al. (2014) Enhanced or reduced fetal growth induced by embryo transfer into smaller or larger breeds alters post-natal growth and metabolism in pre-weaning horses. *PLoS One* 9: e102044.
9. Forhead AJ, Ousey JC, Allen WR, Fowden AL (2004) Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *J Endocrinol* 181: 459-467.
10. Ousey JC, Fowden AL, Wilsher S, Allen WR (2008) The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foals. *Equine Vet J* 40: 673-679.
11. George LA, Staniar WB, Treiber KH, Harris PA, Geor RJ (2009) Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. *Domest Anim Endocrinol* 37: 23-29.
12. van der Heyden L, Lejeune JP, Caudron I, Detilleux J, Sandersen C, et al. (2013) Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *Vet Rec* 172: 68.
13. Martin-Rosset W (2012) *Nutrition et alimentation des chevaux*. France: Quae. 624 p.

14. Arnaud G (2000) Notation de l'état corporel des chevaux de selle et de sport. Paris, France: Institut de l'Élevage, INRA, Institut Français du Cheval et de l'Équitation.
15. Salazar-Ortiz J, Camous S, Briant C, Lardic L, Chesneau D, et al. (2011) Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (*Equus caballus*). *Reprod Biol Endocrinol* 9: 130.
16. Jaeschke G (1975) Routine determination of free hydroxyproline in horse serum methods and normal values. *Zentralblatt für Veterinärmedizin A* 22: 89-101.
17. Valette JP, Robert C, Toquet MP, Denoix JM, Fortier G (2007) Evolution of some biochemical markers of growth in relation to osteoarticular status in young horses: results of a longitudinal study in three breeds. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 4: 23-29.
18. Denoix JM (1990) Sémiologie radiographique générale des articulations. *Pratique Vétérinaire Equine* 22: 14-27.
19. van Weeren PR (2006) Aetiology, diagnosis and treatment of OC(D). *Clinical Techniques in Equine Practice* 5: 248-258.
20. Noguchi K, Gel Y, Brunner R, Konietschke F (2012) nparLD: an R software package for non-parametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *Journal of Statistical Software* 50: 1-23.
21. Doreau M (1994) Le lait de jument et sa production : particularités et facteurs de variation. *Lait* 74: 401-418.
22. Sticker LS, Thompson DL, Jr., Bunting LD, Fernandez JM, DePew CL (1995) Dietary protein and(or) energy restriction in mares: plasma glucose, insulin, non-esterified fatty acid, and urea nitrogen responses to feeding, glucose, and epinephrine. *J Anim Sci* 73: 136-144.
23. Gentry LR, Thompson DL, Jr., Gentry GT, Jr., Davis KA, Godke RA, et al. (2002) The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *J Anim Sci* 80: 2695-2703.
24. Cavinder CA, Burns SA, Coverdale JA, Hammer CJ, G H, et al. (2012) Late gestational nutrition of the mare and potential effects on endocrine profiles and adrenal function of the offspring. *The professional animal scientist* 28: 344-350.
25. Song X, Anderson ST, Cawdell-Smith AJ, Foote CE, Bryden WL. Response of plasma leptin concentrations in mares and foals to maternal body condition; 2014; Gold Coast, QLD. pp. 37.

26. Stull CL, Rodiek AV (1988) Responses of blood glucose, insulin and cortisol concentrations to common equine diets. *J Nutr* 118: 206-213.
27. DePew CL, Thompson DL, Jr., Fernandez JM, Sticker LS, Burleigh DW (1994) Changes in concentrations of hormones, metabolites, and amino acids in plasma of adult horses relative to overnight feed deprivation followed by a pellet-hay meal fed at noon. *J Anim Sci* 72: 1530-1539.
28. Dobbs TN, Foote CE, Cawdell-Smith AJ, Anderson DL, Boston RC, et al. Glucose and insulin dynamics in mares and their foals; 2012; Gold Coast, QLD. pp. 56.
29. Anderson ST, Song X, Velez Aramburo ME, Bartels RA, Cawdell-Smith AJ, et al. Mares of lower body condition score exhibit marked insulin resistance and reduced insulin secretion in late gestation; 2012; Gold Coast, QLD. pp. 36.
30. Fowden AL, Comline RS, Silver M (1984) Insulin secretion and carbohydrate metabolism during pregnancy in the mare. *Equine Vet J* 16: 239-246.
31. Kautzky-Willer A, Prager R, Waldhausl W, Pacini G, Thomaseth K, et al. (1997) Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy. *Diabetes Care* 20: 1717-1723.
32. Thorson JF, Karren BJ, Bauer ML, Cavinder CA, Coverdale JA, et al. (2010) Effect of selenium supplementation and plane of nutrition on mares and their foals: foaling data. *J Anim Sci* 88: 982-990.
33. Wei J, Hanna T, Suda N, Karsenty G, Ducy P (2014) Osteocalcin promotes beta-cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes* 63: 1021-1031.
34. Lee NK, Karsenty G (2008) Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 19: 161-166.
35. Glade MJ, Belling TH (1986) A dietary etiology for osteochondrotic cartilage. *Journal of equine veterinary science* 6: 151-155.
36. Savage CJ, McCarthy RN, Jeffcott LB (1993) Effects of dietary energy and protein on induction of dyschondroplasia in foals. *Equine veterinary journal supplement* 16: 74-79.
37. Glade MJ, Belling TH, Jr. (1984) Growth plate cartilage metabolism, morphology and biochemical composition in over- and underfed horses. *Growth* 48: 473-482.

38. Ralston SL (1996) Hyperglycemia/hyperinsulinemia after feeding a meal of grain to young horses with osteochondritis dissecans (OCD) lesions. *Pferdeheilkunde* 12: 320-322.
39. Pagan JD, Geor RJ, Caddel SE, Pryor PB, Hoekstra KE. The relationship between glycemic response and the incidence of OCD in thoroughbred weanlings: a field study; 2001. pp. 322-325.
40. Glade MJ, Gupta S, Reimers TJ (1984) Hormonal responses to high and low planes of nutrition in weanling thoroughbreds. *J Anim Sci* 59: 658-665.
41. Henson FM, Davenport C, Butler L, Moran I, Shingleton WD, et al. (1997) Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine Vet J* 29: 441-447.
42. Glade MJ, Reimers TJ (1985) Effects of dietary energy supply on serum thyroxine, triiodothyronine and insulin concentrations in young horses. *J Endocrinol* 104: 93-98.
43. Anderson ST, Song X, Cawdell-Smith AJ, Foote CE, Boston RC, et al. Pregnant mares with insulin resistance and beta cell failure continue to exhibit glucose intolerance and diminished insulin responses in a subsequent pregnancy; 2014; Gold Coast, QLD. pp. 38.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Daily nutritional offer (median and IQR) to broodmares in late pregnancy: net energy (A), horse digestible crude proteins (B), raw cellulose (C), and calcium to phosphorus ratio (D). HFU: horse feed units, BW: bodyweight. Values under the asterisks significantly differ between groups (Mann-Whitney test with FDR adjustment).

Figure 2. Mares' bodyweight (A) and body condition score (B) (median and IQR) throughout pregnancy and lactation. O: ovulation, D: start of the diet, F: foaling, W: weaning. Values under the asterisks significantly differ between groups and those under letter "T" tend to differ between both groups (Mann-Whitney with FDR adjustment).

Figure 3. Mares' plasma glucose (A) and insulin (B) concentrations (median and IQR) over a 10-hour monitoring period a fortnight after start of the diet. M: meals. Values under the asterisks significantly

differ and those under letter “T” tend to differ between both groups (Mann-Whitney with FDR adjustment).

Figure 4. Mares’ plasma glucose and insulin increments (median and IQR) during IVGTT before (A, B) and after (C, D) start of the diet. The 5-min period between both dotted lines stands for the glucose injection time. Values under the asterisks significantly differ between both groups (Mann-Whitney with FDR adjustment).

Figure 5. Mares’ plasma NEFA (A) and leptin (B) concentrations (median and IQR) throughout pregnancy and lactation. O: ovulation, D: start of the diet, F: foaling, W: weaning. Values under the asterisks significantly differ and those under letter “T” tend to differ between both groups (Mann-Whitney with FDR adjustment).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to William Martin-Rosset for design of the nutritional plane of broodmares, Joseph Bellonie and Patrice Dupuis for care and management of animals and assistance during metabolic tests, Françoise Ternois for management of NEFA assays, Sarah Valentino for assistance during IVGTT, Céline Houdard for management of clamps and Isabelle Caudron and Brigitte Delière for management of X-rays.

Table 1. Repartition of broodmares between groups “fodder” and “barley” according to age, parity and withers’ height (median [quartile 1-quartile 3], minimum and maximum values).

	<b>Group “fodder” (n=13)</b> SF n=6, AA n=6, SD n=1			<b>Group “barley” (n=12)</b> SF n=8, AA n=3, SD n=1		
	Median [quartile 1-quartile 3]	Min	Max	Median [quartile 1-quartile 3]	Min	Max
<b>Parity (number of foals)</b>	3 [2-3]	2	11	3 [2-4]	2	8
<b>Age (years)</b>	9.2 [8.1-10.2]	6.1	21.2	8.6 [6.9-12.8]	6.1	19.1
<b>Withers’ height (cm)</b>	162.0 [160.0-165.0]	157.0	170.0	162.5 [160.5-165.0]	156.0	168.0

SF: Selle Français, AA: Anglo-Arab or Anglo-Arabian type, SD: Saddlebred.



Table 2. Quality of feedstuff given to broodmares of groups “fodder” and “barley” from November (median gestational day 186) to parturition.

	Chemical composition (per kg of dry matter)			Mineral composition (per kg of dry matter)	
	Net energy (Horse feed units)	Horse digestible crude proteins (g)	Raw cellulose (g)	Calcium (g)	Phosphorus (g)
<b>Homemade mix</b>	1.2	127	52.7	12.1	5.8
<b>Haylage</b>	0.6	104	249.0	7.7	3.8
<b>Hay H1</b>	0.5	30	372.0	3.7	2.1
<b>Hay H2</b>	0.6	88	30.8	6.6	3.8
<b>Excel Prima S<sup>®</sup></b>	NA	NA	NA	375	62.5

Table 3. Daily individual quantities of feeds given to pregnant mares of groups “fodder” and “barley” from November (median gestational day 186) to parturition. H1 and H2 indicate when a different hay batch was used.

Median gestational day	Meal	Type of hay	Group “barley”			Group “fodder”		
			Hay (kg)	Haylage (kg)	Barley mix (kg)	Hay (kg)	Haylage (kg)	Minerals and vitamins (kg)
186	8:45 AM	H1	3	1.5	0	3	1.5	0
	3:45 PM	H1	5	1.5	0	5	1.5	0
200	8:45 AM	H1	3	1	1	3	1.5	0.027
	3:45 PM	H1	5	1	1	6	1.5	0.028
208	8:45 AM	H1	3	1.5	1.5	3	1.5	0.027
	3:45 PM	H1	4	1.5	1.5	6	1.5	0.028
221	8:45 AM	H1	3	1.5	1.5	3	1.5	0.027
	3:45 PM	H1	5	2	1.5	6.5	2	0.028
241	8:45 AM	H1	3	2.5	1.5	3	1.5	0.027
	3:45 PM	H1	4	2.5	2	6.5	2	0.028
272	8:45 AM	H1	3	2.5	1.5	4	2	0.030
	3:45 PM	H1	4	2.5	2	8	2	0.030
282	8:45 AM	H1	1	3	1.5	3	2	0.030
	3:45 PM	H1	3	6	2	6.5	5.5	0.030
304	8:45 AM	H2	1	3	1.5	3	2	0.030
	3:45 PM	H2	3	6	2	6.5	5.5	0.030
321	8:45 AM	H2	1	3	1.5	3	3	0.035
	3:45 PM	H2	3	6	2	7	6	0.035
332	8:45 AM	H2	1	3	1.5	3	3	0.035
	3:45 PM	H2	3	6	2	7	6	0.035

Table 4. Daily nutritional supply to weanlings (6 to 12 months of age).

	Chemical composition (per kg of dry matter)			Mineral composition (per kg of dry matter)	
	Net energy (Horse feed units)	Horse digestible crude proteins (g)	Raw cellulose (g)	Calcium (g)	Phosphorus (g)
<b>Homemade pellet</b>	1.13	102	63.9	7.10	4.90
<b>Hay</b>	0.62	95	315.5	5.85	2.38

Table 5. Foals parameters in groups “fodder” and “barley” (median [quartile 1-quartile 3]). Median values with letter T tended to differ between both groups (Mann-Whitney with FDR adjustment).

	Age (days)	Group “fodder” (n=13 or n=12)	Group “barley” (n=11)
Bodyweight (kg)	1	53.7 [50.0-59.7]	54.3 [50.3-58.3]
	180	241.5 [224.1-266.5]	249.6 [243.5-252.4]
Withers’ height (cm)	1	101.0 [100.0-102.5]	100.5 [99.3-103.0]
	180	134.0 [130.5-136.0]	131.0 [130.0-133.5]
Chest circumference (cm)	1	85.0 [85.0-90.0]	85.0 [82.3-86.3]
	180	144.0 [139.3-146.8]	142.5 [140.0-143.5]
IGF-1 (ng/mL)	0	164.6 [147.4-194.2]	189.9 [165.2-200.7]
	180	272.7 [223.8-382.8]	335.6 [287.1-362.3]
T <sub>4</sub> (ng/mL)	0	408.4 [328.6-427.1]	370.7 [352.9-423.3]
	180	26.4 [21.0-29.2]	22.4 [18.3-24.6]
T <sub>3</sub> (ng/mL)	0	5.7 [4.2-6.5]	5.4 [3.9-8.5]
	180	0.36 [0.31-0.53]	0.36 [0.31-0.44]
NEFA (μmol/L)	3	787.0 [612.0-889.0]	679.0 [452.5-822.5]
	180	647.5 [417.5-924.5]	660.0 [426.0-912.5]
Leptin (ng/mL)	180	1.3 [1.2-1.4]	1.3 [1.3-1.4]
Osteocalcin (ng/mL)	3	68.9 [40.8-92.0] <sup>†</sup>	107.6 [56.2-165.2] <sup>†</sup>
	130	16.2 [13.3-21.6]	15.0 [9.9-22.5]
Hydroxyproline (mg/L)	3	18.5 [14.5-21.3]	16.8 [15.6-18.2]
	130	8.3 [7.9-8.8]	8.8 [8.6-8.8]
CTX-II (ng/mL)	3	2.5 [1.9-2.6]	2.7 [2.4-3.8]
	130	1.1 [1.0-1.1]	1.1 [1.1-1.2]
Glucose AUC (mmol.min/L)	3	114.8 [106.6-133.7]	99.5 [77.1-120.4]
	130	411.0 [338.9-498.1]	409.6 [382.5-448.4]
Insulin AUC (ng.min/L)	3	28.6 [20.0-37.4]	23.8 [17.8-29.9] <sup>†</sup>
	130	30.2 [17.1-46.9]	33.7 [22.0-42.3]
Glucose metabolism rate (mmol/kg/min)	210	0.016 [0.014-0.022]	0.017 [0.016-0.021]

Table 6. Foals' relative risk and odds ratio of osteochondrosis in groups "fodder" and "barley" at 218 days of age.

	<b>Group "fodder" (n=12)</b>	<b>Group "barley" (n=11)</b>	<b>Z statistic</b>	<b>Significance level</b>
<b>Number of unaffected foals</b>	10	6		
<b>Number of osteochondrosis positive foals</b>	2	5		
<b>Relative risk</b>	0.3667	2.7273	1.384	p = 0.1665
<b>95% confidence interval</b>	0.08852-1.5187	0.6584-11.2964		
<b>Odds ratio</b>	0.2400	4.1667	1.452	p = 0.1466
<b>95% confidence interval</b>	0.0394-1.6486	0.6066-28.6219		

Figure 1.

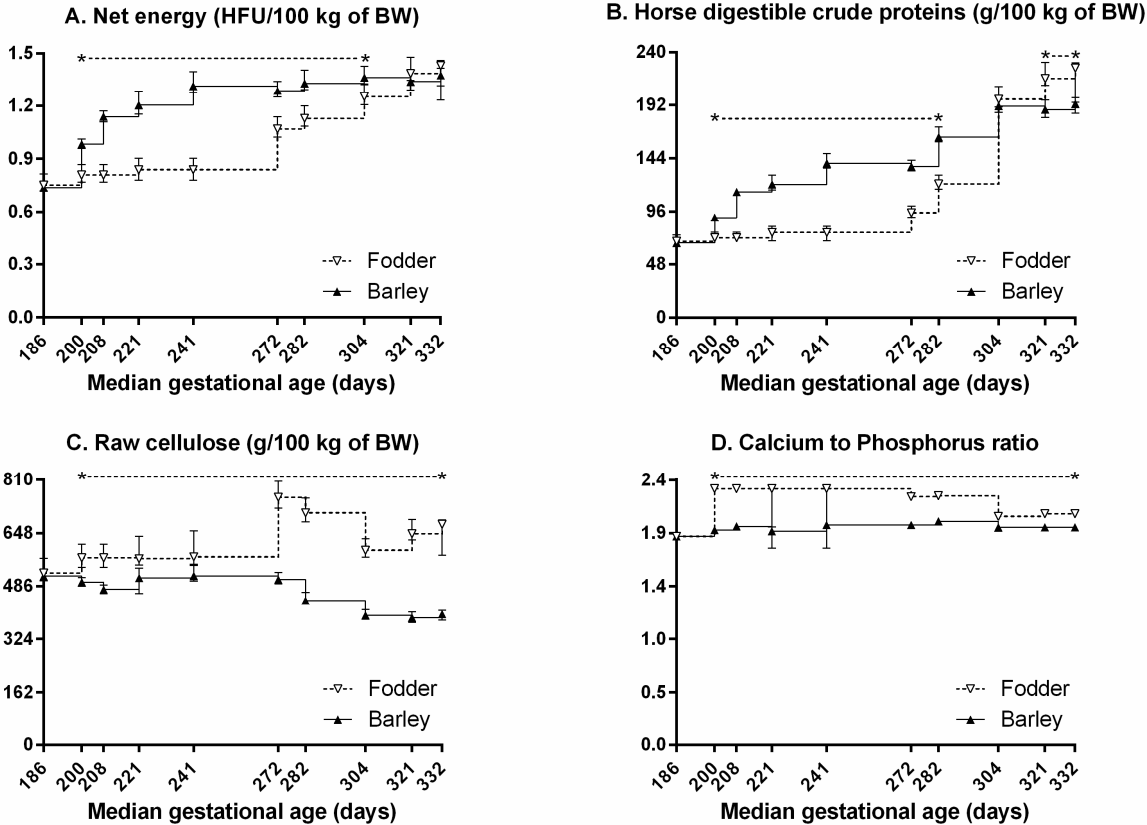


Figure 2.

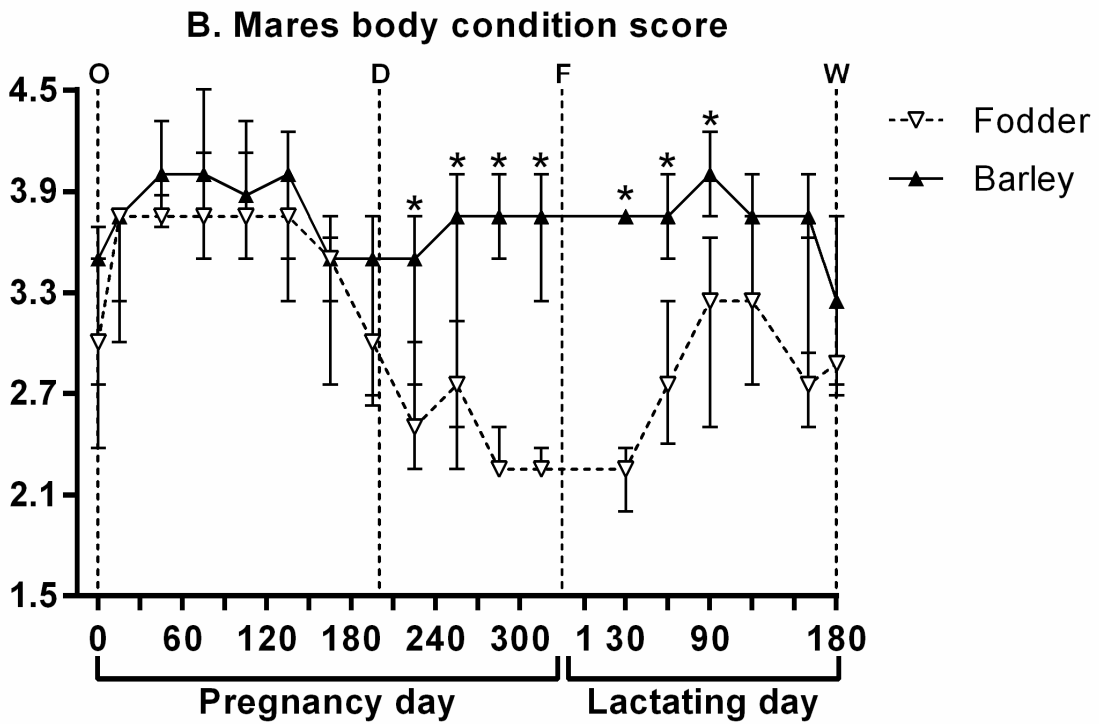
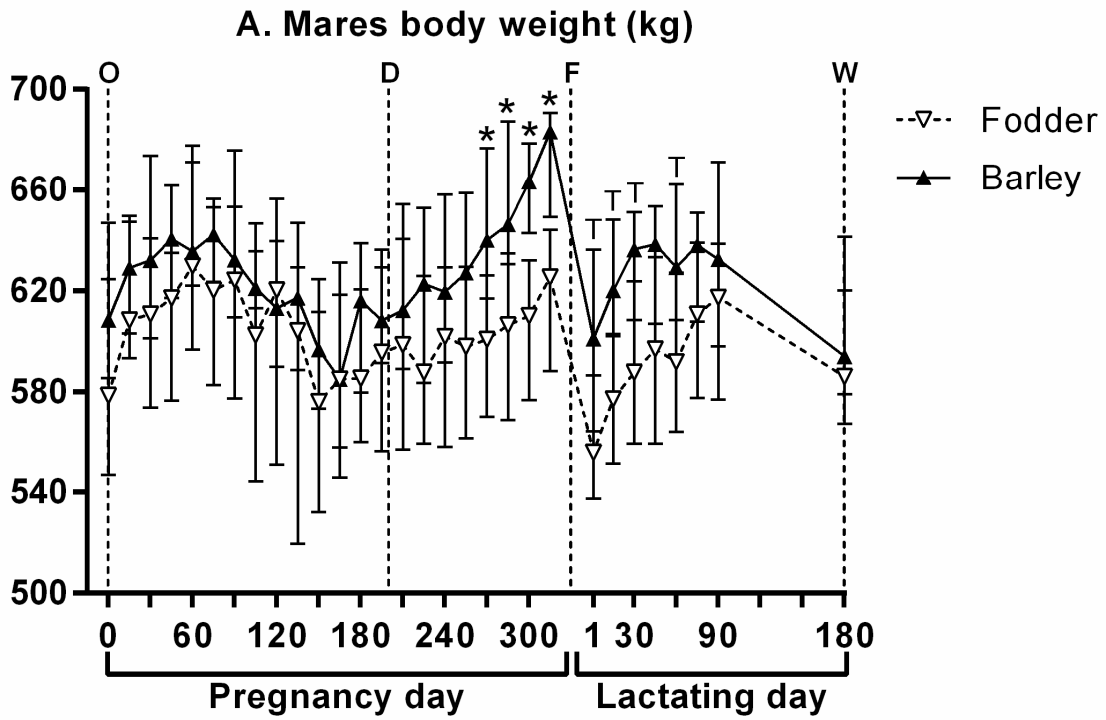


Figure 3.

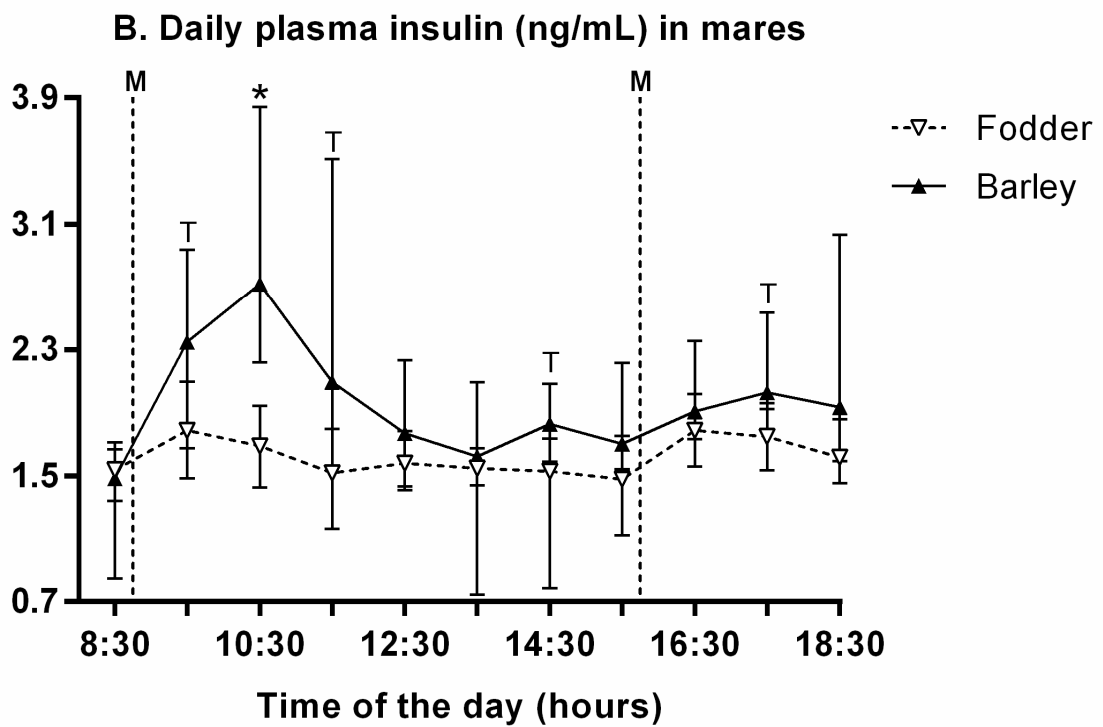
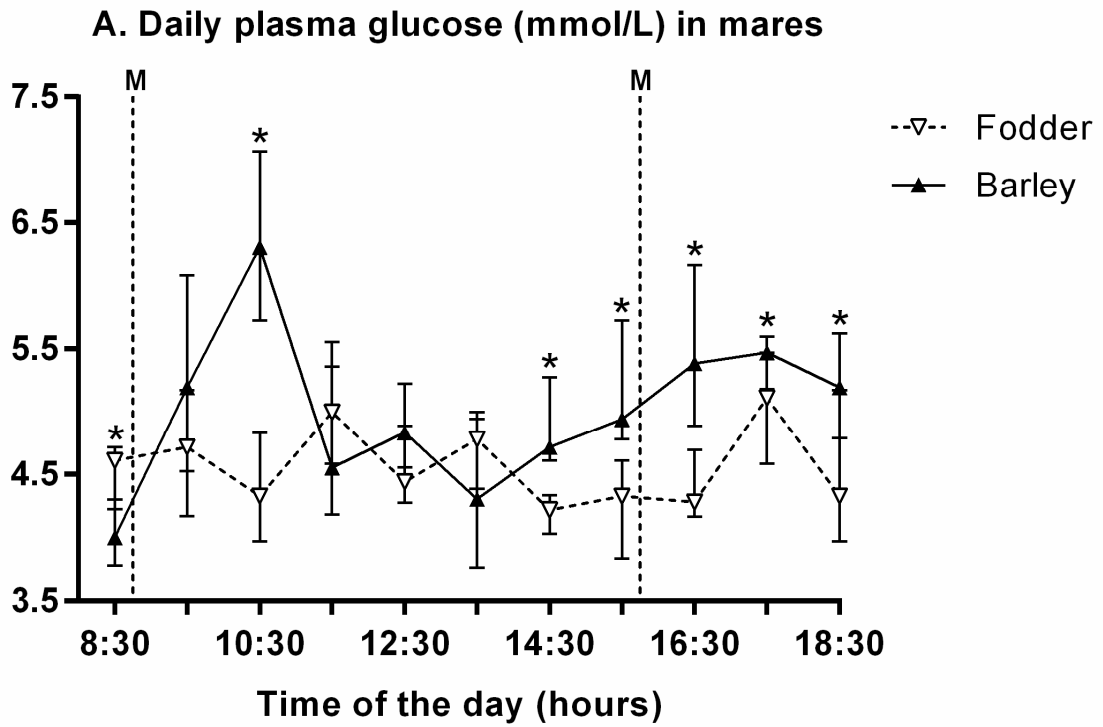




Figure 4.

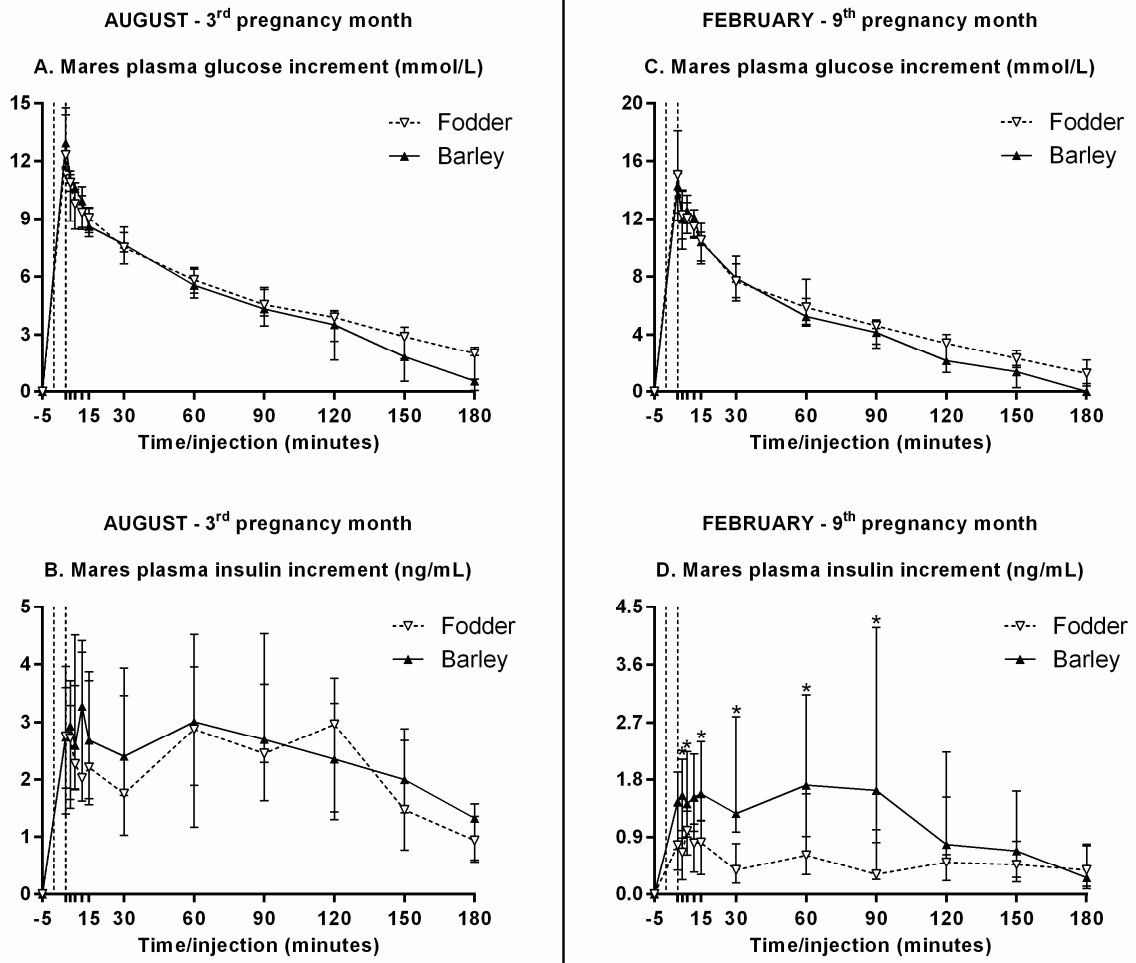
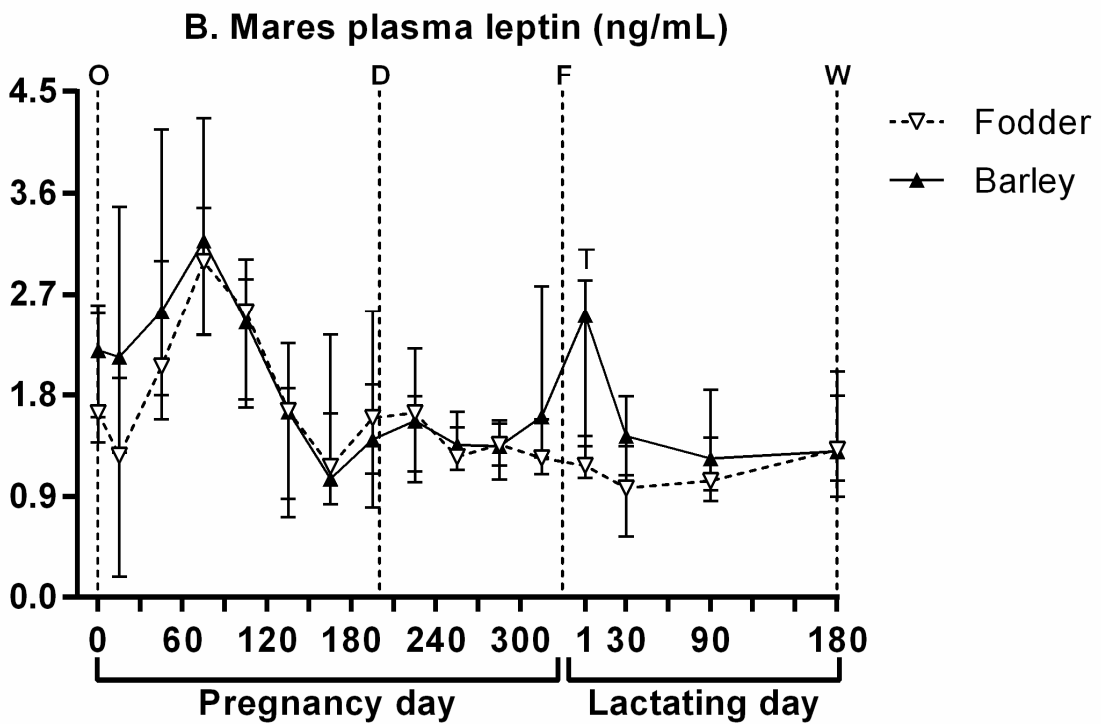
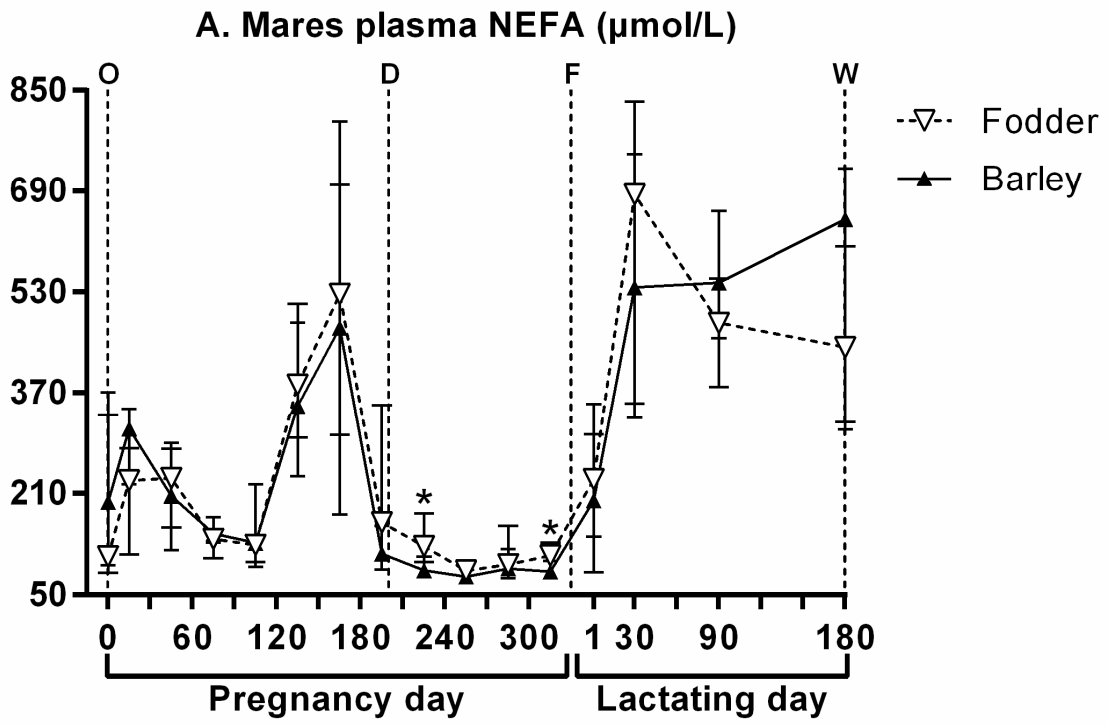


Figure 5.



	<b>Caractéristiques des poulains de race poney (par rapport aux poulains de race selle)</b>
Développement placentaire	↘↘ poids et surface ↘↘ expression des gènes <i>IGF-II</i> , <i>IGF-IR</i> , <i>IGF-IIR</i> , <i>TGFβ1</i> , <i>GLUT1</i> , <i>SNAT2</i> , <i>LPL</i>
Homéostasie énergétique	↗↗ glycémie jusqu'à 1 an ½ ↘↘ concentration en AGNE jusqu'à 1 an ½ - sensibles à l'insuline
Ostéochondrose	- d'animaux atteints (NS)
IGF-I, T4, T3	↗↗ concentration en IGF-I jusqu'à 1 an ½ ↗↗ concentration en T <sub>3</sub> avant sevrage

**Tableau 17.** Principales différences observées entre les races poney et selle dans le cadre du modèle 1 de transferts d'embryons inter-races. NS : non significatif.

## 3. Synthèse, limites et perspectives

### 3.1. Synthèse des modèles

L'objectif de cette thèse était de répondre à la question des origines développementales des anomalies de l'homéostasie glucidique et de la croissance osseuse chez les poulains, d'abord dans le cadre du modèle 1 de transferts d'embryons inter-races, puis dans le cadre du modèle 2 de supplémentation en concentré de la jument gravide.

#### 3.1.1. Modèle 1 : transferts d'embryons entre races de tailles différentes

Les résultats concernant les différences entre races sont résumés dans le **Tableau 17**.

Le modèle 1 a permis de tester l'effet d'une augmentation ou d'une restriction de la croissance fœtale sur la croissance, l'homéostasie glucidique et la prédisposition à l'ostéochondrose du poulain de race poney ou selle après la naissance et jusqu'à 1 an ½. Ainsi, des transferts d'embryons de races poney et selle dans des juments de trait ont été utilisés pour amplifier la croissance fœtale, tandis que des transferts d'embryons de race selle dans des ponettes ont été utilisés pour la restreindre. Jusqu'au sevrage, les poulains témoins ont été élevés par leur mère biologique, tandis que les poulains expérimentaux ont été élevés par leurs mères porteuses.

##### 3.1.1.1. Croissance et métabolisme spécifiques des races poney et de selle

L'analyse des données associées aux races poney et selle a montré que les placentas de race poney sont non seulement plus légers et plus petits, mais que l'allantochoiron présente aussi une expression diminuée des gènes codant IGF-II, IGF-IR, IGF-IIR, TGFβ1, GLUT1, SNAT2 et LPL. Il existe aussi des spécificités de race sur le plan endocrine, puisque les poulains de race poney ont des concentrations plasmatiques plus élevées que les poulains de race selle en IGF-I jusqu'à 1 an ½ et en T<sub>3</sub> jusqu'au sevrage. Contrairement aux poulains de race selle, les poulains de race poney présentent aussi une glycémie à jeun augmentée (dès l'âge de 1 mois) et des concentrations plasmatiques en acides gras non-estérifiés diminuées (dès le sevrage) jusqu'à 1 an ½. Chaque race a donc aussi un métabolisme énergétique propre. De plus, les clamps hyperinsulinémiques euglycémiques mettent en évidence une sensibilité à l'insuline plus faible chez les poulains de race poney à 6 mois, juste après le sevrage, et à 1 an ½. Les tests intraveineux de tolérance au glucose montrent aussi une aire sous la courbe du glucose et un pic de glycémie accrus chez les poulains de race poney à 1 an. Enfin, à 6 mois, 9% des poulains de race poney sont atteints d'ostéochondrose contre 29% des poulains de race selle. L'évolution des lésions est

	<b>Poney-dans-Trait ou poneys « augmentés »</b>	<b>Selle-dans-Poney ou selles « restreints »</b>
Environnement maternel	↗↗ capacité utérine Glycémie basse / ponette ↗↗ production laitière	↘↘ capacité utérine Glycémie élevée / jument de trait ↘↘ production laitière
Croissance fœtale pondérale	Augmentée	Restreinte
Développement placentaire	↗↗ poids et surface Pas d'adaptation fonctionnelle	↘↘ poids et surface ↘↘ expression d' <i>IGF-II</i> et <i>SNAT2</i>
Croissance post-natale	Amplifiée et harmonieuse	Ralentie avant sevrage Puis croissance de rattrapage disharmonieuse
Homéostasie énergétique	↘↘ glycémie jusqu'à 1 an ½ ↗↗ concentration en AGNE jusqu'à 1 an ½ Résistance précoce à l'insuline Puis résistance de type poney	↗↗ glycémie jusqu'à 1 an ½ ↘↘ concentration en AGNE avant sevrage ↗↗ de la sensibilité à l'insuline Puis retour à une sensibilité de type selle
Ostéochondrose	+ d'animaux atteints à 6 mois (NS)	+ d'animaux atteints à 6 mois (***)
IGF-I, T4, T3	↘↘ concentration en T <sub>3</sub> avant sevrage ↘↘ concentration en T <sub>4</sub> en néonatal	↗↗ concentration en T <sub>3</sub> avant sevrage ↗↗ concentration en T <sub>4</sub> en néonatal

**Tableau 18.** Principaux effets du transfert d'embryon en jument de trait chez le poulain de race poney et en ponette chez le poulain de race selle. NS : non significatif. \*\*\* significatif.

favorable dans ces deux lots. En effet, plus aucun poney ne présente de lésions à 1 an ½, contre 10% des poulains de race selle.

**En résumé, l'ensemble de ces données démontre que les profils de croissance et les profils métaboliques des races poney et selle sont bien distincts, les différences entre ces deux lots apparaissant dès la vie fœtale. Cette observation m'a permis de formuler deux questions biologiques, celle des effets post-nataux du transfert d'embryon chez le poulain de race poney d'une part et chez le poulain de race selle d'autre part.**

### **3.1.1.2. Effets d'une croissance fœtale amplifiée chez le poulain poney**

Les résultats obtenus dans ce modèle sont résumés dans le **Tableau 18**.

Le transfert d'un embryon de race poney dans une jument de trait est associé à une durée de gestation plus courte (- 6 jours) et à une croissance pondérale du fœtus augmentée de 57% par rapport aux poneys témoins. Les placentas sont aussi plus lourds et plus grands. Après la naissance, les poneys « augmentés » présentent une croissance pondérale amplifiée jusqu'à 1 an ½ où ils sont toujours 30% plus lourds que les poneys témoins. Cette amplification de la croissance post-natale affecte tous les segments corporels mesurés et peut donc être qualifiée d'harmonieuse. Les poneys « augmentés » ont aussi une concentration plasmatique en T<sub>3</sub> réduite dès 3 jours et jusqu'au sevrage, puis similaire à celle des poneys témoins en post-sevrage. Leur métabolisme énergétique est affecté sur le long terme, puisqu'ils présentent des concentrations plasmatiques en acides gras non-estérifiés accrue (de 3 mois à jusqu'à 1 an ½) et une glycémie à jeun diminuée (dès 1 mois et jusqu'à 1 an ½). De plus, les tests intraveineux de tolérance au glucose montrent que la sécrétion insulinaire à 3 jours des poneys « augmentés » est plus forte, sans que l'aire sous la courbe du glucose soit affectée. Les clamps hyperinsulinémiques euglycémiques ne mettent pas en évidence de différence entre les deux lots de poneys en termes de sensibilité à l'insuline à 6 mois puis à 1 an ½. Enfin, 33% des « poney-dans-trait » sont atteints d'ostéochondrose à 6 mois et 17% à 1 an ½. Cependant, cette augmentation du risque relatif de développer la pathologie n'est pas significative.

**En résumé, les poulains de race poney nés après transferts d'embryons dans des juments de trait ont une croissance post-natale amplifiée, de façon harmonieuse, au moins jusqu'à 1 an ½. Ces poneys « augmentés » présentent une réduction de la concentration plasmatique en hormones thyroïdiennes de la naissance au sevrage. Leur métabolisme énergétique est aussi altéré dès la naissance avec une résistance néonatale à l'insuline, et au moins jusqu'à 1 an ½ avec de fortes variations de leur glycémie et des concentrations plasmatiques en acides gras non-estérifiés (marqueurs de la lipolyse).**



### 3.1.1.3. Effets d'une croissance fœtale restreinte chez le poulain de selle

Les résultats obtenus dans ce modèle sont résumés dans le **Tableau 18**.

Chez les chevaux de selle, le transfert d'embryon dans une ponette rallonge la gestation de 13 à 16 jours par rapport aux gestations « selle dans selle » et « selle-dans-trait », respectivement. Il induit un retard de croissance intra-utérin, puisqu'à la naissance les « selle-dans-poney » sont plus légers de 37 à 42% par rapport aux « selle dans selle » et « selle-dans-trait », respectivement. Ces poulains « restreints » sont dysmatures, avec des articulations hyperlaxes et nécessitent de l'assistance pour se lever dans les premières heures. De plus, ces gestations sont associées à des placentas plus légers et plus petits, dans lesquels l'expression des gènes codant IGF-II et SNAT2 est diminuée. Après la naissance, les selles « restreints » présentent une croissance pondérale ralentie jusqu'au sevrage, puis ils rattrapent les deux autres lots de poulains de race selle. Certains segments corporels restent cependant plus courts sur l'ensemble de la période de suivi. Cette croissance de rattrapage peut donc être qualifiée de disharmonieuse. Les selles « restreints » ont de plus une concentration plasmatique en  $T_3$  augmentée par rapport aux selles témoins à 3 jours et par rapport aux « selle-dans-trait » au sevrage. Leur métabolisme énergétique est affecté sur le long terme, puisqu'ils présentent une concentration plasmatique en acides gras non-estérifiés réduite dès 3 mois et jusqu'au sevrage et une glycémie à jeun accrue dès 1 mois et jusqu'à 1 an ½. Les tests intraveineux de tolérance au glucose montrent que les selles « restreints » tendent à sécréter moins d'insuline à 3 jours, sans que l'aire sous la courbe du glucose ne soit affectée. De plus, les clamps hyperinsulinémiques euglycémiques mettent en évidence une sensibilité à l'insuline accrue à 6 mois et 1 an ½. Enfin, le risque relatif de développer des lésions d'ostéochondrose est significativement augmenté chez ces poulains « restreints » à 6 mois puisque 100% des selles-dans-poneys présentent des lésions. Cependant, la plupart de ces animaux présentent une évolution favorable des lésions et seulement 33% de ces poulains sont encore atteints à 1 an ½.

Ces données montrent par ailleurs que les profils physiologiques des « selle-dans-trait » sont proches de ceux des selles témoins. Néanmoins, ce lot se distingue parfois du lot « extrême » « selle-dans-poney », montrant que s'ils ne sont que peu affectés par l'environnement maternel, ils ne sont pas pour autant indemnes de tout impact.

**En résumé, le principal modèle obtenu chez les poulains de race selle est un modèle de retard de croissance intra-utérin. Ces poulains de race selle nés après transferts d'embryons dans des ponettes ont d'abord une croissance ralentie jusqu'au sevrage, puis une croissance de rattrapage jusqu'à 1 an ½ où, globalement, ils ressemblent aux autres poulains de race selle. Néanmoins, certains segments corporels restent plus courts, leur croissance est de type disharmonieux. Ces poulains « restreints » présentent une augmentation des concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes de la**



	<b>Lot « orge »</b>	<b>Lot « fourrages »</b>
Environnement maternel	Etat corporel stable et optimal 2 élévations de la glycémie et de l'insulinémie - sensible à l'insuline	↘↘ d'état corporel Glycémie et insulinémie constante + sensible à l'insuline
Homéostasie énergétique	↗↗ clairance du glucose à sécrétion d'insuline égale + concentration en ostéocalcine	↘↘ clairance du glucose à sécrétion d'insuline égale - concentration en ostéocalcine
Ostéochondrose	+ d'animaux atteints à 6 mois (NS)	- d'animaux atteints à 6 mois (NS)

**Tableau 19.** Principaux effets de l'apport d'orge dans la ration hivernale de la jument gravide chez le poulain de race selle. NS : non significatif.

naissance au sevrage, en miroir des poneys « augmentés » décrits ci-dessus. Ils sont plus sensibles à l'insuline dès la naissance et jusqu'au sevrage. Leur retour à une sensibilité normale pour la race à l'âge de 1 an ½ est cependant doublé de fortes variations de leurs concentrations plasmatiques en acides gras non-estérifiés et de leur glycémie à jeun jusqu'à cet âge, de nouveau en miroir des poneys « augmentés ». L'environnement maternel restreint a un effet négatif sur leur santé ostéoarticulaire puisque tous les poulains de ce lot sont atteints d'ostéochondrose au sevrage.

### 3.1.2. Modèle 2 : apport d'orge dans la ration de la jument gravide

Le modèle 2 avait pour objectif de tester les effets de la supplémentation en orge de la ration hivernale de la jument gravide (pratique d'élevage traditionnelle) sur la croissance, l'homéostasie glucidique et la prédisposition à l'ostéochondrose du poulain après la naissance et jusqu'au sevrage. Ainsi, des juments de race selle multipares ont reçu une ration hivernale à base de fourrages (régime « fourrages ») ou constituée de fourrages et d'orge (régime « orge ») à partir du 7<sup>ème</sup> mois de gestation et jusqu'à la parturition. Chacun de ces régimes a été distribué en deux repas quotidiens. Après la naissance des poulains, les juments suitées ont été conduites au pâturage.

Les résultats obtenus dans ce modèle sont résumés dans le **Tableau 19**.

#### 3.1.2.1. Des perturbations du métabolisme de la jument gravide puis allaitante

Les juments du lot « orge » maintiennent un état corporel optimal (note d'état supérieure à 3,5) tout au long de la gestation et de la lactation, tandis que l'état corporel des juments du lot « fourrages » diminue jusqu'à atteindre une note d'état inférieure à 2,5. Ces dernières ne rattrapent d'ailleurs pas l'état corporel du lot « orge » avant le 4<sup>ème</sup> mois de lactation. Elles sont en outre plus légères dès le 9<sup>ème</sup> mois de gestation et jusqu'à la parturition. Cette différence de poids vif n'est plus qu'une tendance après la parturition et, dès le 3<sup>ème</sup> mois de lactation, les deux lots présentent des poids vifs similaires. La perte d'état chez les juments du lot « fourrages » est associée à une augmentation transitoire de la concentration plasmatique en acides gras non-estérifiés, en tout début, puis en toute fin d'hivernage. D'autre part, chaque repas du régime « orge » induit une élévation postprandiale de la glycémie et de l'insulinémie très marquée suite au repas matinal et de moindre intensité suite au repas de l'après-midi, alors qu'aucune variation n'est observée dans le lot « fourrages ». Enfin, les tests intraveineux de tolérance au glucose réalisés au mois de février (au 9<sup>ème</sup> mois de gestation) dévoilent une sécrétion d'insuline accrue en réponse au glucose exogène chez les juments du lot « orge » (l'aire sous la courbe du glucose restant inchangée).



### 3.1.2.2. Des perturbations transitoires du métabolisme du poulain

Chez les descendants, les paramètres corporels et endocrines mesurées sont les mêmes d'un lot à l'autre entre la naissance et le sevrage. Cependant, les tests intraveineux de tolérance au glucose chez les nouveau-nés âgés de 3 jours montrent que les poulains du lot « orge » tendent à avoir une aire sous la courbe du glucose diminuée, sans que leur sécrétion insulinaire ne soit affectée par rapport aux poulains du lot « fourrages ». Les poulains du lot « orge » tendent aussi à avoir une concentration plasmatique en ostéocalcine accrue à cet âge. Au-delà de cette période néonatale et jusqu'au sevrage à 6 mois, les deux lots ne présentent plus aucune différence en termes d'homéostasie glucidique. Enfin, la première série de clichés radiographiques réalisée à l'âge de 6 mois montrent que 45% des poulains du lot « orge » présentent des lésions d'ostéochondrose contre 17% des poulains du lot « fourrages ». Néanmoins, cette augmentation du risque relatif de développer la pathologie à 6 mois n'est pas significative.

**En résumé, la supplémentation de la ration hivernale avec de l'orge permet à la jument gravide de maintenir un état corporel stable, mais induit des perturbations du métabolisme glucidique postprandial et diminue la sensibilité à l'insuline de l'organisme. Les quelques impacts métaboliques de cette nutrition précoce observés chez les poulains sont de faible intensité et se limitent à la période néonatale. La supplémentation en orge de la jument gravide pourrait augmenter la prédisposition du poulain à l'ostéochondrose, en tout cas au sevrage.**

## 3.2. Limites des modèles

Chacun des deux modèles utilisés dans cette thèse ont leurs limites. Ces dernières ont été partiellement discutées dans les articles précédents. L'objet de cette partie n'est pas d'en dresser la liste exhaustive, mais de souligner les principaux facteurs confondants qui doivent être pris en compte dans l'utilisation des données issues de ces travaux.

### 3.2.1. Choix des méthodes de reproduction

Une des principales limites du modèle 1 réside dans l'obtention des lots témoins par inséminations artificielles et des lots expérimentaux par transferts d'embryons. Des modifications épigénétiques, établies au cours de la gamétogenèse et du développement préimplantatoire de l'embryon, sont impliquées dans la régulation de la chromatine aux différentes étapes du développement des ovocytes et des embryons. Ces modifications concernent entre autres la méthylation des îlots CpG de l'ADN ou l'acétylation des histones. Elles sont responsables notamment de l'expression monoallélique de certains gènes (empreinte parentale) et d'un remodelage global ou local de la chromatine (Reik et al, 2001;



Li, 2002; Morgan et al, 2005; De La Fuente, 2006; Reik, 2007; Ciccone et Chen, 2009; Kota et Feil, 2010).

Le stress engendré par la manipulation des gamètes ou des embryons au cours de ces phases critiques peut causer des altérations des marques épigénétiques. Un lien a été établi entre les méthodes de procréation médicalement assistée (en particulier la fécondation *in vitro* et l'injection intracytoplasmique de sperme) et des anomalies de la reprogrammation épigénétique, susceptibles d'entraîner la mort des embryons ou des anomalies chez les nouveau-nés tels que les syndromes d'Angelman, de Beckwith-Wiedeman ou de Prader-Willy (Cox et al, 2002; De Rycke et al, 2002; Thompson et al, 2002; Gosden et al, 2003; Ludwig et al, 2005). Des études expérimentales chez l'Homme et la souris ont montré que la superovulation (Sato et al, 2007), la maturation *in vitro* de l'ovocyte (Kerjean et al, 2003; Borghol et al, 2006; Wang et al, 2010) et le milieu de culture des gamètes et des embryons (Doherty et al, 2000; Market-Velker et al, 2010) étaient susceptibles d'affecter la reprogrammation épigénétique des embryons.

Les répercussions à long terme de ces manipulations antérieures à l'implantation sont aujourd'hui une certitude. Donjacour et ses collègues ont observé un effet du milieu de culture des embryons (blastocystes obtenus par fécondation *in vitro*, transférés après 4 à 4,5 jours d'incubation dans des milieux différents) sur le poids, la taille du cœur et la tolérance au glucose de souriceaux mâles pendant les 5 premiers mois *postpartum*, ainsi qu'un effet de la fécondation *in vitro* sur l'expression des GLUT4 dans le tissu adipeux de souris femelles adultes (Donjacour et al, 2014). Banrezes et ses collègues ont montré qu'une période d'incubation beaucoup plus courte (15 heures) des embryons (obtenus à partir d'ovocytes fécondés *in vivo* et transférés au stade deux cellules) dans des milieux induisant des altérations de l'activité mitochondriale était susceptible d'affecter le poids des souris adultes âgés de 6 mois (Banrezes et al, 2011). Quelques études antérieures ont aussi relaté un effet de la fécondation *in vitro* ou de l'injection intracytoplasmique de sperme sur le poids, la tolérance au glucose, la sécrétion d'insuline, la quantité de tissu adipeux, la concentration plasmatique en leptine et le comportement (anxiété, mémoire) de souris adultes, souvent avec des réponses propres au sexe (Ecker et al, 2004; Fernandez-Gonzalez et al, 2004; Scott et al, 2010). Chez l'ovine et le bovin, la culture des embryons issus de fécondations *in vivo* ou *in vitro* conduit à une croissance fœtale excessive (syndrome du « gros veau ») (McEvoy et al, 1998; McEvoy et al, 2000; McEvoy et al, 2001), associée chez l'agneau à une hypométhylation du promoteur de l'allèle maternel du gène codant IGF-IIR (Young et al, 2001). Ces aspects sont peu explorés chez l'équin, bien que quelques éléments soient en faveur d'un impact de certaines manipulations, comme la maturation *in vitro* des ovocytes, sur la mise en place de l'acétylation des histones (Franciosi et al, 2012).

Les éventuels effets du transfert d'embryon, associé à une durée limitée à quelques heures de culture au stade blastocyste, restent inconnus sur le long terme. Dans cette étude,



tous les embryons de races poney (lot P-T) et selle (lot S-P) ont été transportés d'une station expérimentale à l'autre, en Equitainer, dans le même milieu de culture pendant un maximum de 6 heures avant que le transfert ne soit réalisé. Aucune des juments donneuses d'embryons n'a fait l'objet d'une superovulation. En l'état actuel des connaissances, il semble donc que les impacts des manipulations préimplantatoires aient été au moins partiellement maîtrisés. Les faibles différences entre les poulains de race selle issus de transferts en juments de trait (lot S-T) et les poulains de race selle témoins issus d'inséminations artificielles (lot S-S) entre la naissance et 18 mois sont pour l'instant peu favorables à l'hypothèse d'un biais induit par les différentes méthodes de reproduction utilisées dans cette étude. Mais ces deux lots ont été produits dans la même station et les embryons n'ont pas nécessité de transport. L'observation précédente ne suffit donc pas à écarter l'hypothèse d'un biais induit par la durée de culture associée au transport.

D'autres paramètres liés à la pratique du transfert d'embryons n'ont pas été pris en compte, mais leurs effets potentiels méritent d'être soulignés. Wallace et ses collègues ont en effet produit des embryons de brebis obèses et à l'état corporel optimal avant de les transférer dans des brebis sur-nourries. Cette étude a démontré que l'obésité des brebis donneuses améliorerait sensiblement la tolérance au glucose des agneaux à l'âge de deux mois (Wallace et al, 2014). Ces éléments complexifient notre modèle de transferts d'embryons inter-races, puisque les ponettes donneuses des embryons transférés en juments de trait (lot P-T) avaient des notes d'état corporel autour de 5, signe d'une obésité. Pour aller plus loin, citons les travaux de Williams et ses collègues qui ont montré que l'embryon préimplantatoire est sensible à toutes sortes d'aspects de la santé maternelle, tels qu'une inflammation systémique, avec des conséquences sur le poids et la pression sanguine des souris mâles adultes (Williams et al, 2011).

### **3.2.2. Interaction entre les environnements anté- et post-nataux**

Aucun des deux modèles utilisés dans cette thèse ne peut être considéré comme un modèle de programmation fœtale au sens strict du terme. En effet, seules les données collectées à la naissance témoignent de la manipulation de la croissance fœtale. Il faut plutôt parler de deux modèles de programmation développementale, combinant les effets d'une manipulation du développement anténatal (d'une part, la restriction ou l'augmentation de la capacité utérine, avec les facteurs confondant cités plus haut et d'autre part, l'apport d'orge dans la ration de la jument gravide) et les effets de paramètres modulant le développement post-natal, à savoir les paramètres de production laitière propres à chaque race pour le modèle 1 et ceux propres à l'état corporel des juments gravides et allaitantes pour le modèle 2.

Rappelons que le rendement laitier varie d'une race à l'autre : il serait de 14 à 24,5 kg/jour pour une jument de trait de 700 kg, de 10 à 17,5 kg/jour pour une jument de





selle de 500 kg et de 15 kg/jour pour une ponette de 300 kg (§1.1.2.2) (von Neseni et al, 1958; Doreau et al, 1986; Doreau et Boulot, 1989b; Martin-Rosset, 2012). Ni la production laitière, ni la quantité de lait ingérée par les poulains n'ont été mesurées dans cette étude. Il est cependant probable que les poulains de race selle transférés en ponettes (lot S-P) aient subi à la fois une restriction anténatale de l'espace utérin et une restriction post-natale de la nutrition lactée. *A contrario*, les poulains de race poney transférés en juments de trait (lot P-T) ont profité d'une augmentation anténatale de la capacité utérine, dont les effets ont pu être amplifiés par la production laitière excessive associée à la race trait (relativement à la race poney). Ces réflexions doivent être nuancées par le fait que la demande et *a fortiori* la taille du poulain détermine en partie le niveau de production laitière de la jument (§1.1.2.2).

L'alimentation en fin de gestation est aussi déterminante pour la croissance post-natale du poulain *via* la production laitière (Goater et al, 1981). Dans l'espèce équine, la reconstitution des réserves corporelles est prioritaire sur la lactation : chez les juments maigres, près de 30% de l'énergie ingérée est utilisée pour le dépôt des réserves, tandis que chez les juments grasses, une part plus importante de l'énergie est utilisée pour la synthèse des lipides du lait (§1.1.2.4.1) (Doreau, 1994). L'état corporel insuffisant des juments n'ayant reçu que des fourrages, en fin de gestation et pendant les tous premiers mois de lactation, pourrait avoir affecté la quantité de lait produite ou sa composition. Cette hypothèse est peu probable, car les paramètres de croissance mesurés dans les deux lots de poulains étaient similaires, mais elle ne peut pas être écartée.

Des méthodes de mesure de la production laitière existent. La traite avec ou sans injection d'ocytocine est la méthode la plus ancienne, mais elle surestime (avec ocytocine) ou sous-estime (sans ocytocine) le rendement laitier (Doreau et Boulot, 1989a). La pesée du poulain avant et après chaque tétée est aussi une possibilité. Selon les protocoles rapportés, le poulain est séparé de sa mère de 45 minutes (Bouwman et van der Schee, 1978) à 8 heures (Doreau et Boulot, 1989a). Puis, à chaque tétée, la différence entre les deux pesées est un indicateur de la quantité de lait ingérée. C'est une méthode peu fiable pour la mesure du rendement laitier *per se*, puisqu'en espaçant les tétées, la capacité sécrétoire de la mamelle est susceptible de diminuer. La mesure de la quantité de lait ingérée aurait cependant présenté un intérêt dans le cadre de notre modèle, mais cette technique perturbe la relation jument-poulain et le comportement naturel de tétée et elle est lourde à mettre en œuvre, la fréquence de tétée étant élevée chez le poulain (toutes les heures chez le nouveau-né). Une dernière technique existe, dans laquelle un marqueur radioactif (eau lourde ou eau tritiée) est injecté par voie intraveineuse chez le poulain. Une relation mathématique relie l'ingestion d'eau (de lait) à la concentration du marqueur dans l'organisme. Cette méthode est très fiable à condition que le lait soit la seule source d'eau du poulain. Elle ne peut donc pas être utilisée au-delà de l'âge de 2 mois (Ofstedal et al, 1983; Boulot, 1987). L'utilisation de deux marqueurs est alors nécessaire (un marqueur de l'eau corporelle de la mère et un marqueur de l'eau corporelle de son petit) (Holleman et al, 1975;



Wright et Wolff, 1976), mais cette technique n'a jamais été utilisée chez le cheval du fait de sa complexité.

La mesure de la composition du lait est aussi possible. Nous avons collecté des échantillons de laits chez tous les animaux et à plusieurs stades. Les échantillons ont été confiés au Dr. Ferlay et au Dr. Andueza de l'« Unité de Recherche sur les Herbivores » de l'INRA de Theix, qui mettent actuellement au point une méthode spectrométrique en proche infrarouge pour mesurer la teneur en lactose et en matière grasse du lait, dans le cadre du projet QUALILAIT financé par l'IFCE. Les données de composition du lait de la naissance (colostrum) à l'âge de 6 mois (sevrage) permettront de définir au moins partiellement la nature des paramètres post-nataux impliqués dans les effets observés chez les poulains.

Un bon moyen de distinguer les effets de la manipulation de la croissance fœtale des effets des paramètres post-nataux aurait été de mettre en place des adoptions croisées, comme souvent dans les modèles murins de programmation intra-utérine (Shepherd et al, 1997; Nyirenda et al, 2001; Ozanne et Hales, 2004; Khan et al, 2005; Wattez et al, 2014). Par exemple, il aurait été intéressant de comparer des poneys portés par des juments de trait, mais élevés soit par des ponettes, soit par des juments de trait (lot P-T actuel) ou même de les comparer avec des poneys portés par les ponettes, mais élevés par des juments de trait. Les faibles effectifs obtenus dans chacun des lots expérimentaux n'auraient pas permis d'établir autant de groupes après la parturition que ce soit dans le cadre du modèle 1 ou 2. De plus, un tel protocole aurait été très complexe à gérer, les durées de gestation étant très variables chez la jument et les dates de poulinage étant donc imprévisibles (Howell et Rollins, 1951; Rollins et Howell, 1951; Rossdale et Ricketts, 1983; Perez et al, 2003; Meliani et al, 2011). Les méthodes d'adoption sont parfois difficiles à mettre en œuvre (Chavatte, 1991). L'idéal pour établir un tel protocole aurait été d'induire la lactation chez des juments non-gravidés, ce qui est possible avec un traitement combinant progestérone, oestrogènes et un antagoniste de la dopamine (sulpiride ou domperidone). La lactation peut être induite au printemps ou à l'automne, chez la jument cyclique ayant déjà été gravide. L'induction de la lactation permet l'adoption du poulain par la jument avec un comportement maternel jusqu'au sevrage et une vitesse de croissance du poulain normale (Chavatte-Palmer et al, 2002; Daels et al, 2002; Nagy et al, 2002; Porter et al, 2002).

### 3.2.3. Gestion de l'alimentation des poulains

La conduite de l'alimentation des poulains est un dernier élément critiquable du modèle de transferts d'embryons inter-races, inhérent à la répartition des animaux entre deux stations expérimentales aux organisations différentes. Tout d'abord, certains poulains de race selle transférés dans des ponettes (lot S-P) ont connus un environnement nutritionnel plus riche et de composition différente de leurs congénères pendant les deux premiers mois *postpartum*, puisqu'ils n'ont pas pu être conduits en pâture avant cet âge. La



question d'un éventuel effet de cette supplémentation maternelle sur le long terme reste en suspens. Ces ponettes allaitantes ayant reçu des concentrés, la mesure des teneurs en lactose et matière grasse de leur lait donnera une idée de l'ampleur de la perturbation nutritionnelle par rapport au reste du lot. Soulignons toutefois que ces poulains ne diffèrent pas du reste du lot pour les paramètres étudiés en termes d'homéostasie glucidique, de croissance et de statut ostéoarticulaire.

D'autre part, la gestion de la distribution des rations (outre leurs compositions divergentes) au cours du premier hiver dans chacune des stations est discutable. De l'âge de 6 à 12 mois, les poulains de la station de l'UEPAO (lots P-P et S-P) recevaient leurs aliments concentrés en deux repas quotidiens, tandis que les poulains de la station de l'IFCE (lots P-T, S-S et S-T) recevaient leur aliment concentré en plusieurs repas tout au long de la journée *via* un distributeur automatique. Le premier système de distribution est susceptible de provoquer deux pics quotidiens de glycémie et d'insulinémie, qui sont précisément des facteurs rapportés dans l'étiologie de l'ostéochondrose (Glade et al, 1984; Glade et Reimers, 1985; Glade et Belling, 1986; Lewis, 1996; Henson et al, 1997). Il est alors troublant que les poulains de race selle transférés dans des ponettes (lot S-P) soient les poulains présentant une prédisposition accrue à l'ostéochondrose au cours de ce premier hiver. Cependant, l'examen radiographique a été réalisé peu de temps après le sevrage et le début de la supplémentation hivernale, modérant cette hypothèse. La distribution automatique de l'aliment concentré en plusieurs repas tout au long de la journée atténue probablement l'intensité des réponses glycémique et insulinémique quotidiennes, mais elle n'a pas été mesurée. Un suivi sur une journée de ces réponses aux repas aurait apporté une information complémentaire, mais aurait été difficile à mettre en œuvre sans perturber le comportement alimentaire naturel de ces poulains, qui se présentent spontanément au distributeur pour obtenir leur ration.

Enfin, les aliments distribués aux poulains des deux modèles tout au long du protocole auraient mérités une analyse plus avancée, notamment des teneurs en oligoéléments. Pour n'en citer qu'un, le cuivre semble avoir son importance dans l'étiologie des affections ostéoarticulaires juvéniles chez le cheval. Il s'agit en effet d'un facteur d'hydroxylation indispensable à la formation de l'hydroxyproline, composant essentiel du collagène (Yuan et al, 2011) et d'un facteur nécessaire à la vascularisation du cartilage lors du processus d'ossification enchondrale. Des études expérimentales ont montré que la carence cuivrée augmente la prévalence de ces affections chez le poulain, tandis qu'une supplémentation en cuivre aurait un effet protecteur (Bridges et Harris, 1988; Knight et al, 1990; Hurtig et al, 1993). Mais certains auteurs n'ont observé aucun effet bénéfique de la supplémentation en cuivre sur ces affections (Pearce et al, 1998a; Pearce et al, 1998b). Il semble d'autre part que le lait de jument soit pauvre en cuivre et que le poulain soit tributaire de ses réserves hépatiques en cuivre pendant les premiers mois *postpartum*. Ces réserves dépendent de l'apport de la ration de la jument gravide. Pearce et ses collègues ont



montré que la supplémentation en cuivre des juments gravides diminuait la prévalence des inflammations de certaines articulations et des lésions du cartilage (Pearce et al, 1998c), alors que d'autres auteurs n'ont observé aucun effet de la supplémentation des poulinières (Gee et al, 2007) et aucune corrélation entre la teneur en cuivre du foie des poulains à la naissance et le nombre de lésions d'ostéochondrose jusqu'à l'âge d'un an. Cependant, la diminution du nombre et de la gravité des lésions était plus importante chez les poulains ayant les plus fortes teneurs hépatiques en cuivre à la naissance (van Weeren et al, 2003). L'étude des apports en oligoéléments dans l'étiologie de l'ostéochondrose n'était pas l'objet de ces travaux, mais leur mesure aurait permis d'écarter certains facteurs potentiellement confondant.





### 3.3. Perspectives

Il y a une dizaine d'années, les travaux de Allen et ses collègues validaient l'hypothèse d'une programmation fœtale de l'homéostasie glucidique (mesurée à l'âge de 2 jours) (Forhead et al, 2004), de la fonction cardiovasculaire (évaluée à l'âge de 6 jours) (Giussani et al, 2003) et de la fonction cortico-surrénalienne (pendant les premières 48 heures *postpartum*) (Ousey et al, 2004) du poulain. Ils confirmaient aussi l'hypothèse des origines développementales de la croissance jusqu'à l'âge de 3 ans (Allen et al, 2002), la lactation des juments étant, là aussi, un facteur supplémentaire impliqué dans le mécanisme programmeur. Leurs travaux ouvraient de nombreuses voies à explorer. Cette thèse s'est concentrée sur les aspects de l'homéostasie glucidique et de la croissance des poulains et notre intérêt pour le développement des lésions d'ostéochondrose a défini la fenêtre d'étude, de la naissance à l'âge de 18 mois.

Une partie de ces travaux a mis en avant des différences dans les régulations de l'homéostasie énergétique et de la croissance entre les poneys (Welsh) et les chevaux de selle (Pur-Sang, Anglo-Arabe et Selle Français). Jusqu'à présent, je n'ai décrit que les différences existant entre ces deux races, sans m'attarder sur les chevaux de race trait (Comtois et Bretons), excepté dans le cadre de mon étude de la fonction de transfert du placenta. Ces derniers seront intégrés dans une prochaine analyse qui se concentrera sur les spécificités de races en cours de croissance. Certaines différences de sensibilité à l'insuline entre les poneys et les chevaux de selle adultes ont été décrites depuis plusieurs années (Jeffcott et al, 1986; Rijnen et van der Kolk, 2003; Bamford et al, 2014), mais il est important de garder à l'esprit que des différences existent aussi entre des races de tailles et conformations plus proches, comme les Lusitaniens et les Trotteurs Américains (Bamford et al, 2014). Ces spécificités de races doivent être considérées lors de l'établissement des modèles expérimentaux chez l'équin. Les poneys présentent certes l'avantage d'être plus faciles de manipulation du fait de leur petite taille, mais la question se pose de l'extrapolation des données obtenues dans ce modèle à d'autres races.

En termes de pratique du transfert embryonnaire dans l'espèce équine, les différences métaboliques et endocrines entre les races méritent d'être prises en compte dans le choix de la receveuse lors du transfert d'embryon. Ainsi, les poulains de race selle nés de porteuses de race poney (lot S-P) ont non seulement été confrontés à un espace utérin restreint, mais aussi à un environnement riche en glucose, les données de la littérature s'accordant sur la faible sensibilité à l'insuline des ponettes adultes (Jeffcott et al, 1986; Rijnen et van der Kolk, 2003; Bamford et al, 2014). Notre modèle de transferts d'embryons montre aussi l'importance de la taille de la receveuse sur la croissance du poulain et alerte les personnels impliqués dans la pratique du transfert d'embryons, dans le sens où le choix de la receveuse est une composante essentielle de la santé du futur poulain. La sélection d'une receveuse de conformation proche de celle de la donneuse n'est pas une



nouveauté, l'impact de la taille de la jument sur la croissance post-natale du poulain ayant été démontré par des croisements inter-races dès 1938 (Walton et Hammond, 1938). Ce facteur de sélection de la receveuse est particulièrement essentiel lorsque les stud-books n'approuvent les animaux que s'ils répondent à des critères précis de taille au garrot.

Le modèle de transferts d'embryons inter-races, en validant le concept de programmation développementale chez le cheval au moins jusqu'à l'âge de 18 mois, ouvre la porte à de nombreuses questions, car de nombreux paramètres de l'environnement maternel sont susceptibles d'être modulés par l'Homme au sein des élevages et ainsi de modifier le phénotype post-natal. En cela, le modèle d'apport d'orge dans la ration hivernale de la jument gravide représente un modèle très proche des préoccupations de tous les éleveurs. L'augmentation des apports énergétiques et protéiques maternels n'a eu que peu d'impact sur l'homéostasie énergétique des poulains, avec des effets transitoires limités à la période néonatale. Même si les effets de l'environnement maternel sur le développement du poulain jusqu'au sevrage ont été faibles, le suivi de ces animaux continue. En effet, le modèle de transferts d'embryons inter-races a démontré qu'une évolution de la régulation du métabolisme énergétique en cours de croissance est possible, comme le démontre la diminution de la sensibilité à l'insuline des poulains restreints (lot S-P) de la naissance à l'âge de 18 mois. D'autre part, les poulains issus de ce second modèle seront soumis à un challenge alimentaire au cours de leur deuxième hiver entre 18 et 24 mois et l'étude de leurs réponses métaboliques et endocrines permettra peut-être de révéler une programmation précoce de l'organisme. D'autre part, notre apport d'orge dans la ration était relativement limité (maximum 3,5 kg par jour), alors qu'en pratique, l'apport peut aller jusqu'à 6 kg dans certains élevages de chevaux de course, constituant une raison supplémentaire de ne pas écarter la piste de l'alimentation de la jument gravide dans l'étiologie des anomalies de l'homéostasie glucidique et des perturbations de la croissance osseuse chez le poulain.

La question se pose de savoir si c'est l'apport de concentré dans la ration (et les pics postprandiaux de glucose et d'insuline) ou l'état corporel de la jument qui joue un rôle dans les effets observés sur les poulains dans le cadre de ce modèle. C'est pourquoi un troisième modèle a été mis en place dans notre équipe, où deux lots de juments gravides ont reçu une ration hivernale à base d'orge en quantités suffisantes pour induire un surpoids voire une obésité d'une part et un état corporel optimal d'autre part. Dans ce modèle, les deux régimes devraient induire des pics postprandiaux de glucose et d'insuline et permettre dans une certaine mesure de se dédouaner de cet effet. Les poulains issus de ces gestations sont nés au printemps 2014 et font partie des travaux de thèse de Mlle Robles.

Face à la prévalence élevée de l'ostéochondrose dans les populations équinnes, que la sélection génétique ne parvient pas à éradiquer, l'étiologie fœtale des maladies du cheval représente pour les éleveurs un espoir de prévenir précocement l'apparition de cette pathologie aux lourdes conséquences économiques sur la filière des sports hippiques et



équestres. Les données relatives au développement des lésions d'ostéochondrose présentées dans cette thèse doivent à ce jour être manipulées avec précaution, d'une part car certaines informations doivent encore être précisées (la sévérité des lésions notamment), d'autre part car les faibles effectifs ne sont pas représentatifs de la population. De plus, dès le plus jeune âge, certains marqueurs biochimiques du turnover osseux évoluent différemment chez les poulains de races Pur-Sang, Selle Français et Trotteur Français (Valette et al, 2007), ce qui rend les comparaisons encore plus ardues et il semble que ces marqueurs ne soient que peu informatifs du statut ostéoarticulaire de l'individu. A ce jour, les données générées dans cette thèse constituent des indices tendant à valider l'hypothèse d'une origine fœtale du développement des lésions d'ostéochondrose.

Aujourd'hui, de nombreuses questions restent en suspens. Les animaux des deux modèles étudiés n'ont pas encore tous atteint l'âge adulte et leur physiologie est encore susceptible d'évoluer, différemment selon les manipulations précoces dont ils ont fait l'objet. Des aspects inexplorés dans cette thèse ont aussi pu être affectés comme le démontrent les travaux de Allen et ses collègues (système cardiovasculaire, fonction cortico-surrénalienne). Les effets de la programmation développementale apparaissent souvent chez l'individu vieillissant ou confronté à un événement révélateur (« second hit ») (Hanson et al, 2011; Barouki et al, 2012). Ils peuvent aussi persister dans les générations futures (Kaati et al, 2007; Aiken et Ozanne, 2014; Li et al, 2014; Vickers, 2014), comme démontré chez l'Homme (Pembrey et al, 2006), la souris (Dunn et Bale, 2011; Fullston et al, 2012) ou encore le porc (Gonzalez-Bulnes et al, 2014). Ces effets peuvent être transmis par des altérations de la fonction de reproduction de cette première génération. C'est pourquoi les testicules des poulains des deux modèles ont été prélevés au moment des castrations par l'équipe du Dr. Bouraïma-Lelong du laboratoire « Œstrogènes Reproduction Cancer » de l'Institut de Biologie Fondamentale Appliquée (Université de Caen). Elle se concentrera sur l'étude des récepteurs aux œstrogènes dans les testicules (Pearl et al, 2011), d'abord avec une analyse histochimique des récepteurs aux œstrogènes ER $\alpha$ , ER $\beta$  et GPR30 dans les différents types cellulaires sur coupe histologique, puis avec une recherche et une quantification des transcrits de ces récepteurs par RT-qPCR et enfin, une quantification relative des récepteurs aux œstrogènes dans les cellules de Leydig isolées par cytométrie de flux. En effet, les œstrogènes seraient impliqués dans la régulation de la qualité de la semence de l'étalon. Notre équipe prévoit aussi de suivre la croissance folliculaire des pouliches de cette première génération et, par la suite, la production d'une seconde génération pourrait être envisagée.

Enfin, la programmation fœtale passe par l'apposition de marques épigénétiques au niveau de l'ADN et des histones (Gabory et al, 2011; Jammes et al, 2011; O'Sullivan et al, 2012; Gabory et al, 2013). Le placenta est un organe facile d'accès, jouant un rôle crucial dans la modulation des effets de ces marques. Les marques épigénétiques n'ont pas du tout été explorées dans cette thèse, faute d'outils disponibles actuellement. Dans le futur, il est



d'abord envisagé d'utiliser une approche génomique par séquençage direct de l'ARN dans le placenta, pour déterminer quels gènes sont modifiés par les différentes manipulations de la croissance fœtale utilisées dans ces travaux. Par la suite, une approche par gène cible pour étudier la méthylation (pyroséquençage) sera utilisée, à moins que de nouveaux outils soient disponibles. Ces approches permettront aussi d'explorer les éventuels dimorphismes sexuels dans la réponse à l'environnement maternel qui n'ont pas pu être abordés dans cette thèse.





## 4. Conclusion

Au-delà de mon propre travail, j'ai résumé dans cette thèse l'ensemble des connaissances actuelles relatives aux origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD) chez l'équin. Ce concept selon lequel la plasticité des tissus du fœtus et du poulain a des effets sur le phénotype du cheval adulte permet d'envisager des interventions précoces, qui pourraient permettre d'améliorer la santé et pourquoi pas les performances de cet animal athlète, comme cela a été suggéré chez l'Homme (Hanson et al, 2011; Hanson et Gluckman, 2011).

L'objectif de cette thèse était dans un premier temps de valider le concept de DOHaD chez le poulain, au-delà de la période néonatale et jusque bien après le sevrage, puisque les animaux ont fait l'objet d'un suivi jusqu'à l'âge de 1 an et demi. Pour y répondre, un modèle de transferts d'embryons inter-races a été mis en place afin de restreindre ou d'augmenter la croissance fœtale. L'objectif a été atteint puisque des réponses adaptatives et évolutives à ces manipulations précoces du développement ont été observées, en termes de croissance, de régulation de l'homéostasie glucidique et de perturbations de la maturation du cartilage.

Dans UN second temps, l'objectif a été d'induire une perturbation de la croissance fœtale plus proche des préoccupations actuelles d'élevage. Un modèle de juments gravides supplémentées avec un aliment concentré *versus* non-supplémentées a ainsi été mis en place. A ce jour, les poulains ont fait l'objet d'un suivi jusqu'au sevrage et les faibles effets observés sur la tolérance au glucose des nouveau-nés avaient disparu à la fin de la période d'étude. Les données du premier modèle laissent cependant entrevoir la possibilité d'une évolution du phénotype au-delà de cet âge charnière.

Ces travaux ne permettent pas de répondre à l'ampleur des questionnements liés à la DOHaD chez l'équin. Ils apportent toutefois des éléments de réponse qui, s'ils ne peuvent aujourd'hui être traduits en recommandations à l'éleveur, suffisent à l'alerter sur l'impact de la gestion des poulinières à long terme.



## Références

- Abad, V, Meyers, J L, Weise, M, Gafni, R I, Barnes, K M, Nilsson, O et al. 2002. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 143: 1851-1857.
- Abu, E O, Horner, A, Kusec, V, Triffitt, J T et Compston, J E. 1997. The localization of androgen receptors in human bone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82: 3493-3497.
- Abu, E O, Horner, A, Kusec, V, Triffitt, J T et Compston, J E. 2000. The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85: 883-889.
- Agabriel, J, Trillaud-Geyl, C, Martin-Rosset, W et Jussiaux, M. 1982. Utilisation de l'ensilage de maïs par le poulain de boucherie. *INRA Productions Animales* 49: 5-13.
- Aiken, C E et Ozanne, S E. 2014. Transgenerational developmental programming. *Human reproduction update* 20: 63-75.
- Alexander, G. 1964. Studies on the Placenta of the Sheep (*Ovis Aries L.*). Effect of Surgical Reduction in the Number of Caruncles. *Journal of reproduction and fertility* 7: 307-322.
- Aljada, A, Ghanim, H, Mohanty, P, Syed, T, Bandyopadhyay, A et Dandona, P. 2004. Glucose intake induces an increase in activator protein 1 and early growth response 1 binding activities, in the expression of tissue factor and matrix metalloproteinase in mononuclear cells, and in plasma tissue factor and matrix metalloproteinase concentrations. *The American journal of clinical nutrition* 80: 51-57.
- Allen, D B. 1996. Growth suppression by glucocorticoid therapy. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 25: 699-717.
- Allen, W R et Moor, R M. 1972. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *Journal of reproduction and fertility* 29: 313-316.
- Allen, W R et Stewart, F. 2001. Equine placentation. *Reproduction, fertility, and development* 13: 623-634.
- Allen, W R et Wilsher, S. 2009. A review of implantation and early placentation in the mare. *Placenta* 30: 1005-1015.
- Allen, W R, Hamilton, D W et Moor, R M. 1973. The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *The Anatomical record* 177: 485-501.
- Allen, W R, Wilsher, S, Stewart, F, Stewart, F, Ousey, J, Ousey, J et al. 2002a. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. *Endocrinology of pregnancy. The Journal of endocrinology* 172: 237-246.
- Allen, W R, Wilsher, S, Tiplady, C et Butterfield, R M. 2004. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction* 127: 67-77.
- Allen, W R, Wilsher, S, Turnbull, C, Stewart, F, Ousey, J, Rosedale, P D et al. 2002b. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* 123: 445-453.

- Allen, W R, Wilsher, S, Turnbull, C, Stewart, F, Ousey, J, Rossdale, P D et al. 2002. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* 123: 445-453.
- Allen, W R. 1982. Immunological aspects of the equine endometrial cup reaction. *J Reprod Fert Suppl.* 31: 57-94.
- Anderson, H C. 2003. Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports* 5: 222-226.
- Ansari, T, Beech, D, Sibbons, P D, Rossdale, P D, Ousey, J C et Chavatte, P. 1998. Pilot investigations into microanatomical defects associated with IUGR in the horse and other domestic animals. In: *Third International Workshop on Equine Perinatology: Comparative aspects*, Sydney, Australia
- Antczak, D F et Allen, W R. 1989. Maternal immunological recognition of pregnancy in equids. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 37: 69-78.
- Arnaud, G. 2000. Notation de l'état corporel des chevaux de selle et de sport. Institut de l'Élevage, INRA, Institut Français du Cheval et de l'Équitation, Paris, France.
- Attig, L, Brisard, D, Larcher, T, Mickiewicz, M, Guilloteau, P, Boukthir, S et al. 2013. Postnatal leptin promotes organ maturation and development in IUGR piglets. *PloS one* 8: e64616.
- Attig, L, Larcher, T, Gertler, A, Abdennebi-Najar, L et Djiane, J. 2011. Postnatal leptin is necessary for maturation of numerous organs in newborn rats. *Organogenesis* 7: 88-94.
- Attig, L, Solomon, G, Ferezou, J, Abdennebi-Najar, L, Taouis, M, Gertler, A et al. 2008. Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *International journal of obesity* 32: 1153-1160.
- Aurich, C, Aurich, J E et Parvizi, N. 2001. Opioidergic inhibition of luteinising hormone and prolactin release changes during pregnancy in pony mares. *The Journal of endocrinology* 169: 511-518.
- Bailey, S R, Habershon-Butcher, J L, Ransom, K J, Elliott, J et Menzies-Gow, N J. 2008. Hypertension and insulin resistance in a mixed-breed population of ponies predisposed to laminitis. *American journal of veterinary research* 69: 122-129.
- Baird, J, Kurshid, M A, Kim, M, Harvey, N, Dennison, E et Cooper, C. 2011. Does birthweight predict bone mass in adulthood? A systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 22: 1323-1334.
- Baker, J, Liu, J P, Robertson, E J et Efstratiadis, A. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75: 73-82.
- Ballock, R, Mita, B C, Zhou, X, Chen, D H et Mink, L M. 1999. Expression of thyroid hormone receptor isoforms in rat growth plate cartilage in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14: 1550-1556.

- Bamford, N J, Potter, S J, Harris, P A et Bailey, S R. 2014. Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. *Domestic animal endocrinology* 47: 101-107.
- Bamford, N J, Potter, S J, Harris, P A et Bailey, S R. 2014. Breed differences in insulin sensitivity and insulinemic responses to oral glucose in horses and ponies of moderate body condition score. *Domestic animal endocrinology* 47: 101-107.
- Banach, M A et Evans, J W. 1981. Effects of inadequate energy during gestation and lactation on the oestrus cycle and conception rates of mares and of their foals weights. In: 7th equine nutrition and physiology symposium, Virginia State University, VA. p 97-100.
- Bandyopadhyay, G, Sajan, M P, Kanoh, Y, Standaert, M L, Quon, M J, Lea-Currie, R et al. 2002. PKC-zeta mediates insulin effects on glucose transport in cultured preadipocyte-derived human adipocytes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87: 716-723.
- Banrezes, B, Sainte-Beuve, T, Canon, E, Schultz, R M, Cancela, J et Ozil, J P. 2011. Adult body weight is programmed by a redox-regulated and energy-dependent process during the pronuclear stage in mouse. *PloS one* 6: e29388.
- Barker, D J et Osmond, C. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1: 1077-1081.
- Barker, D J, Gluckman, P D, Godfrey, K M, Harding, J E, Owens, J A et Robinson, J S. 1993a. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341: 938-941.
- Barker, D J, Hales, C N, Fall, C H, Osmond, C, Phipps, K et Clark, P M. 1993b. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62-67.
- Barker, D J, Winter, P D, Osmond, C, Margetts, B et Simmonds, S J. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2: 577-580.
- Barker, D J. 1990. The fetal and infant origins of adult disease. *Bmj* 301: 1111.
- Barnard, R, Haynes, K M, Werther, G A et Waters, M J. 1988. The ontogeny of growth hormone receptors in the rabbit tibia. *Endocrinology* 122: 2562-2569.
- Barnes, R J, Comline, R S, Fowden, A et Silver, M. 1979. Insulin secretion in the fetal foal and mare. *Journal of Physiology-London* 295: P77-P78.
- Baron, J, Klein, K O, Colli, M J, Yanovski, J A, Novosad, J A, Bacher, J D et al. 1994a. Catch-up growth after glucocorticoid excess: a mechanism intrinsic to the growth plate. *Endocrinology* 135: 1367-1371.
- Baron, J, Klein, K O, Yanovski, J A, Novosad, J A, Bacher, J D, Bolander, M E et al. 1994b. Induction of growth plate cartilage ossification by basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 135: 2790-2793.
- Barouki, R, Gluckman, P D, Grandjean, P, Hanson, M et Heindel, J J. 2012. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environmental health : a global access science source* 11: 42.

- Battut, I, Colchen, S, Fieni, F, Tainturier, D et Bruyas, J F. 1997. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine veterinary journal. Supplement* : 60-62.
- Bazaes, R A, Salazar, T E, Pittaluga, E, Pena, V, Alegria, A, Iniguez, G et al. 2003. Glucose and lipid metabolism in small for gestational age infants at 48 hours of age. *Pediatrics* 111: 804-809.
- Beaumont, A et Cassier, P. 1982. Développement des vertébrés. . In: Dunod (ed.) *Biologie animale : les cordés, anatomie comparée des vertébrés.* . p 73-98. Bordas, Paris, Paris, France.
- Benhajali, H, Ezzaouia, M, Lunel, C, Charfi, F et Hausberger, M. 2013. Temporal feeding pattern may influence reproduction efficiency, the example of breeding mares. *PloS one* 8: e73858.
- Bennett, P H, Burch, T A et Miller, M. 1971. Diabetes mellitus in American (Pima) Indians. *Lancet* 2: 125-128.
- Beresford, J N, Gallagher, J A, Poser, J W et Russell, R G. 1984. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)2D3, 24,25(OH)2D3, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metabolic bone disease & related research* 5: 229-234.
- Bernardeau, P, Chavatte, P, Clément, F, Ecot, P, Noue, P, Plongere, G et al. 2008. *Gestion de la jument - Guide pratique.* p 168-228. Les Haras Nationaux, France.
- Bhavnani, B R et Short, R V. 1973. Formation of steroids by the pregnant mare. IV. Metabolism of 14 C-mevalonic acid and 3 H-dehydroisoandrosterone injected into the fetal circulation. *Endocrinology* 92: 1397-1404.
- Bhavnani, B R, Short, R V et Solomon, S. 1969. Formation of estrogens by the pregnant mare. I. Metabolism of 7-3H-dehydroisoandrosterone and 4-14C-androstenedione injected into the umbilical vein. *Endocrinology* 85: 1172-1179.
- Bhavnani, B R, Short, R V et Solomon, S. 1971. Formation of estrogens by the pregnant mare. II. Metabolism of 14C-acetate and 3H-cholesterol injected into the fetal circulation. *Endocrinology* 89: 1152-1157.
- Bigot, G, Bouzidi, A, Rumelhart, R, Roux, R, Vantome, Y, Collobert-Lauguier, C et al. 1990. Evolution au cours de la croissance des propriétés biomécaniques de l'os du canon du cheval. In: 16ème Journée de la Recherche Equine, Paris. p 64-76.
- Bigot, G, Trillaud-Geyl, C, Jussiaux, M et Martin-Rosset, W. 1987. Elevage du cheval de selle de sevrage au débouillage : alimentation hivernale, croissance et développement. *INRA Productions Animales* 69: 45-53.
- Billingham, R C, Brama, P A, van Weeren, P R, Knowlton, M S et McIlwraith, C W. 2004. Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals. *American journal of veterinary research* 65: 143-150.
- Blair, H T, Jenkinson, C M, Peterson, S W, Kenyon, P R, van der Linden, D S, Davenport, L C et al. 2010. Dam and granddam feeding during pregnancy in sheep affects milk supply in

- offspring and reproductive performance in grand-offspring. *Journal of animal science* 88: E40-50.
- Blanchard, T L, Varner, D D, Schumacher, J, Love, C C, Brinsko, S P et Rigby, S L. 2005. Manuel de reproduction équine. p 101-111. Maloine, France.
- Boerboom, D, Brown, K A, Vaillancourt, D, Poitras, P, Goff, A K, Watanabe, K et al. 2004. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biology of reproduction* 70: 391-399.
- Borghol, N, Lornage, J, Blachere, T, Sophie Garret, A et Lefevre, A. 2006. Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation. *Genomics* 87: 417-426.
- Borton, A, Anderson, D L et Lyford, S. 1973. Studies of protein quality and quantity in the early weaned foal. In: 3rd Equine nutrition and physiology symposium, University of Florida (Gainesville). p 19-22.
- Boulot, S. 1987. L'ingestion de la jument. Etude de quelques facteurs de variation au cours du cycle gestation-lactation. Implications nutritionnelles et métaboliques., ENSA Rennes, Université de Rennes I, France.
- Boulot, S. 1987. L'ingestion de la jument. Etude de quelques facteurs de variation au cours du cycle gestation-lactation. Implications nutritionnelles et métaboliques., ENSA Rennes, Université de Rennes I, France.
- Bouman, A A, Scheffer, P G, Ooms, M E, Lips, P et Netelenbos, C. 1995. Two bone alkaline phosphatase assays compared with osteocalcin as a marker of bone formation in healthy elderly women. *Clinical chemistry* 41: 196-199.
- Bouret, S G et Simerly, R B. 2006. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clinical genetics* 70: 295-301.
- Bouwman, H et van der Schee, W. 1978. Composition and production of milk from Dutch warmblood saddle horse mares. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde* 40: 39-53.
- Bouwman, H et van der Schee, W. 1978. Composition and production of milk from Dutch warmblood saddle horse mares. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde* 40: 39-53.
- Braam, Å, Näsholm, A., Roepstorff, L., Philipsson, J. 2011. Genetic variation in durability of Swedish Warmblood horses using competition results. *Livestock Science* 142: 181-187.
- Braidman, I P, Davenport, L K, Carter, D H, Selby, P L, Mawer, E B et Freemont, A J. 1995. Preliminary in situ identification of estrogen target cells in bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 10: 74-80.
- Brama, P A, TeKoppele, J M, Bank, R A, van Weeren, P R et Barneveld, A. 1999. Influence of site and age on biochemical characteristics of the collagen network of equine articular cartilage. *American journal of veterinary research* 60: 341-345.
- Breuer, L H et Golden, D L. 1971. Lysine requirements of the immature equine. *Journal of animal science* 33: 227.



- Bridges, C H et Harris, E D. 1988. Experimentally induced cartilaginous fractures (osteocondritis dissecans) in foals fed low-copper diets. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193: 215-221.
- Brosnahan, M M et Paradis, M R. 2003. Demographic and clinical characteristics of geriatric horses: 467 cases (1989-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223: 93-98.
- Buff, P R, Dodds, A C, Morrison, C D, Whitley, N C, McFadin, E L, Daniel, J A et al. 2002. Leptin in horses: tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *Journal of animal science* 80: 2942-2948.
- Burch, W M et Van Wyk, J J. 1987. Triiodothyronine stimulates cartilage growth and maturation by different mechanisms. *The American journal of physiology* 252: E176-182.
- Butterfield, R M et Matthews, R G. 1979. Ovulation and the movement of the conceptus in the first 35 days of pregnancy in Thoroughbred mares. *J Reprod Fert Suppl.* 27: 447.
- Byers, P D et Brown, R A. 2006. Cell columns in articular cartilage physes questioned: a review. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 14: 3-12.
- Caillaud, M et Doligez, P. 2013. Le transfert d'embryons chez les équidés. <http://www.harasnationaux.fr/information/accueil-equipaedia/reproduction/techniques-de-reproduction/transfert-dembryons.html?type=98> 2014.
- Camarda, A J, Butler, W T, Finkelman, R D et Nanci, A. 1987. Immunocytochemical localization of gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentin. *Calcified tissue international* 40: 349-355.
- Camus, J P. 1966. [Gout, diabetes, hyperlipemia: a metabolic trisndrome]. *Revue du rhumatisme et des maladies osteo-articulaires* 33: 10-14.
- Carantoni, M, Abbasi, F, Azhar, S, Chen, Y D, Klebanov, M, Wang, P W et al. 1998. Plasma leptin concentrations do not appear to decrease insulin-mediated glucose disposal or glucose-stimulated insulin secretion in women with normal glucose tolerance. *Diabetes* 47: 244-247.
- Carlson, C S, Cullins, L D et Meuten, D J. 1995. Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply. *Veterinary pathology* 32: 641-647.
- Carlsten, J, Sandgren, B et Dalin, G. 1993. Development of osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of Standardbred trotters. I. A radiological survey. *Equine veterinary journal supplement* 25: 42(47).
- Carter, R A, Treiber, K H, Geor, R J, Douglass, L et Harris, P A. 2009. Prediction of incipient pasture-associated laminitis from hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies. *Equine veterinary journal* 41: 171-178.
- Cartmill, J A, Thompson, D L, Jr., Gentry, L R, Pruett, H E et Johnson, C A. 2003a. Effects of dexamethasone, glucose infusion, adrenocorticotropin, and propylthiouracil on plasma leptin concentrations in horses. *Domestic animal endocrinology* 24: 1-14.

- Cartmill, J A, Thompson, D L, Jr., Storer, W A, Crowley, J C, Huff, N K et Waller, C A. 2005. Effect of dexamethasone, feeding time, and insulin infusion on leptin concentrations in stallions. *Journal of animal science* 83: 1875-1881.
- Cartmill, J A, Thompson, D L, Jr., Storer, W A, Gentry, L R et Huff, N K. 2003b. Endocrine responses in mares and geldings with high body condition scores grouped by high vs. low resting leptin concentrations. *Journal of animal science* 81: 2311-2321.
- Carton, T. 2004. Examen radiographique des membres de 270 poulains au sevrage : anomalies et signes locaux associés, ENVA, France.
- Cavalieri, R R, Castle, J N et McMahon, F A. 1984. Effects of dexamethasone on kinetics and distribution of triiodothyronine in the rat. *Endocrinology* 114: 215-221.
- Cavinder, C A, Burns, S A, Coverdale, J A, Hammer, C J, G, H et Hinrichs, K. 2012. Late gestational nutrition of the mare and potential effects on endocrine profiles and adrenal function of the offspring. *The professional animal scientist* 28: 344-350.
- Ceddia, R B, Koistinen, H A, Zierath, J R et Sweeney, G. 2002. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16: 1163-1176.
- Chagin, A S, Lindberg, M K, Andersson, N, Moverare, S, Gustafsson, J A, Savendahl, L et al. 2004. Estrogen receptor-beta inhibits skeletal growth and has the capacity to mediate growth plate fusion in female mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19: 72-77.
- Chavatte, P, Holton, D, Ousey, J C et Rosedale, P D. 1997. Biosynthesis and possible biological roles of progestagens during equine pregnancy and in the newborn foal. *Equine veterinary journal supplement* 24: 89-95.
- Chavatte, P. 1991. Maternal behaviour in the horse, theory and practical applications to foal rejection and fostering. *Equine Veterinary Education* 3: 215-220.
- Chavatte, P. 1995. Biosynthesis and function of corticoids and progestagens in equine pregnancy, University of Cambridge, England.
- Chavatte, P. 1997. Lactation in the mare. *Equine veterinary education* 9: 62-67.
- Chavatte-Palmer, P, Arnaud, G, Duvaux-Ponter, C, Brosse, L, Bougel, S, Daels, P et al. 2002. Quantitative and qualitative assessment of milk production after pharmaceutical induction of lactation in the mare. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 16: 472-477.
- Chavatte-Palmer, P, Daels, P F, Arnaud, G, Duvaux-Ponter, C, Brosse, L, Guillaume, D et al. 2000a. Quantitative and qualitative assessment of milk production after pharmaceutical induction of lactation in the mare. In: *Annual Meeting of the Society for Theriogenology*
- Chavatte-Palmer, P, Debus, N, Dupont, C et Camous, S. 2014. Nutritional programming and the reproductive function of the offspring. *Animal production Science* 54: 1166-1176.
- Chavatte-Palmer, P, Duchamp, G, Palmer, E, Ousey, J C, Rosedale, P D et Lombes, M. 2000b. Progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptors in the uterus and mammary

- glands of mares from mid- to late gestation. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 661-672.
- Chenu, C, Valentin-Opran, A, Chavassieux, P, Saez, S, Meunier, P J et Delmas, P D. 1990. Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures. *Bone* 11: 81-86.
- Chevalier, F et Palmer, E. 1982. Ultrasonic echography in the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32: 423-430.
- Choi, K et Kim, Y B. 2010. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *The Korean journal of internal medicine* 25: 119-129.
- Chomczynski, P et Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162: 156-159.
- Christenson, R H. 1997. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical biochemistry* 30: 573-593.
- Chrysis, D, Ritzen, E M et Savendahl, L. 2003. Growth retardation induced by dexamethasone is associated with increased apoptosis of the growth plate chondrocytes. *The Journal of endocrinology* 176: 331-337.
- Ciccone, D N et Chen, T. 2009. Histone lysine methylation in genomic imprinting. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 4: 216-220.
- Cleary, O B, Trumble, T N, Merritt, K A et Brown, M P. 2010. Effect of exercise and osteochondral injury on synovial fluid and serum concentrations of carboxy-terminal telopeptide fragments of type II collagen in racehorses. *American journal of veterinary research* 71: 33-40.
- Clegg, M T, Boda, J M et Cole, H H. 1954. The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin. *Endocrinology* 54: 448-463.
- Clement, K et Karsenty, G. 2005. Contrôle neural du remodelage osseux : le rôle crucial de la leptine. *Médecine/sciences* 21: 681-682.
- Cohen, B, Novick, D et Rubinstein, M. 1996. Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274: 1185-1188.
- Cooper, C, Eriksson, J G, Forsen, T, Osmond, C, Tuomilehto, J et Barker, D J. 2001. Maternal height, childhood growth and risk of hip fracture in later life: a longitudinal study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 12: 623-629.
- Cooper, C, Fall, C, Egger, P, Hobbs, R, Eastell, R et Barker, D. 1997. Growth in infancy and bone mass in later life. *Annals of the rheumatic diseases* 56: 17-21.
- Cooper, C, Westlake, S, Harvey, N, Javaid, K, Dennison, E et Hanson, M. 2006. Review: developmental origins of osteoporotic fracture. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 17: 337-347.

- Couroucé, A, Geffroy, O et Valette, J P. 2001. Affections ostéoarticulaires juvéniles chez le jeune trotteur français : prévalence, score radiographique et relation avec la performance. In: 27ème journée de la recherche équine, Paris. p 135-145.
- Cox, G F, Burger, J, Lip, V, Mau, U A, Sperling, K, Wu, B L et al. 2002. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *American journal of human genetics* 71: 162-164.
- Cox, J E. 1975. Oestrone and equilin in the plasma of the pregnant mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 463-468.
- Crevier-Denoix, N et Denoix, J-M. 2005. Croissance et maturation du squelette équin. *Prat Vét Equine 0 (Pathologie ostéoarticulaire du jeune)*: 5-13.
- Crump, A, Donaldson, W L, Miller, J, Kydd, J H, Allen, W R et Antczak, D F. 1987. Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens on horse trophoblast. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 35: 379-388.
- Curhan, G C, Chertow, G M, Willett, W C, Spiegelman, D, Colditz, G A, Manson, J E et al. 1996. Birth weight and adult hypertension and obesity in women. *Circulation* 94: 1310-1315.
- Cymbaluk, N F et Christison, G I. 1990. Environmental effects on thermoregulation and nutrition of horses. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 6: 355-372.
- Daels, P F, Albrecht, B A et Mohammed, H O. 1998. Equine chorionic gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares. *Biology of reproduction* 59: 1062-1068.
- Daels, P F, Duchamp, G, Massoni, P et Chavatte, P. 2002. Induction of lactation in non-foaling mares and growth of foals raised by mares with induced lactation. *Theriogenology* 58: 859-861.
- Dandona, P, Aljada, A, Mohanty, P, Ghanim, H, Bandyopadhyay, A et Chaudhuri, A. 2003. Insulin suppresses plasma concentration of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9. *Diabetes care* 26: 3310-3314.
- Daughaday, W H, Hall, K, Raben, M S, Salmon, W D, Jr., van den Brande, J L et van Wyk, J J. 1972. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235: 107.
- Davico, M J, Faulconnier, Y, Coxam, V, Dubroeuq, H, Martin-Rosset, W et Barlet, J P. 1994. Systemic bone growth factors in light breed mares and their foals. *Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique* 102: 115-119.
- Davies Morel, M C G. 2008. *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. 3ème édition ed. CABI, AberystwythUK.
- Davison, K E, Potter, G D, Greene, L W, Evans, J W et Mc Mullan, W C. 1987. Lactation and reproductive performance of mares fed added dietary fat during late gestation and early lactation. In: 10th equine nutrition and physiology symposium, Colorado State University, CO. p 87-92.
- De Blasio, M J, Gatford, K L, Robinson, J S et Owens, J A. 2007. Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and

- adiposity in the young lamb. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 292: R875-886.
- De La Fuente, R. 2006. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Developmental biology* 292: 1-12.
- de Mestre, A, Noronha, L, Wagner, B et Antczak, D F. 2010. Split immunological tolerance to trophoblast. *The International journal of developmental biology* 54: 445-455.
- De Rycke, M, Liebaers, I et Van Steirteghem, A. 2002. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Human reproduction* 17: 2487-2494.
- DeFronzo, R A, Tobin, J D et Andres, R. 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *The American journal of physiology* 237: E214-223.
- Denker, H W, Betteridge, K J, Sirois, J. 1987. Shedding of the capsule and proteinase activity in the horse embryo. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 35: 703-703.
- Dennison, E M, Harvey, N C et Cooper, C. 2013. Programming of osteoporosis and impact on osteoporosis risk. *Clinical obstetrics and gynecology* 56: 549-555.
- Dennison, E M, Syddall, H E, Sayer, A A, Gilbody, H J et Cooper, C. 2005b. Birth weight and weight at 1 year are independent determinants of bone mass in the seventh decade: the Hertfordshire cohort study. *Pediatric research* 57: 582-586.
- Dennison, E, Cole, Z et Cooper, C. 2005a. Diagnosis and epidemiology of osteoporosis. *Current opinion in rheumatology* 17: 456-461.
- Denoix, J M, Jeffcott, L B, McIlwraith, C W et van Weeren, P R. 2013. A review of terminology for equine juvenile osteochondral conditions (JOCC) based on anatomical and functional considerations. *Vet J* 197: 29-35.
- Denoix, J M, Valette, J P, Robert, C, Bousseau, B, Perrot, P, Heiles, P et al. 1997. Etude radiographique des affections ostéoarticulaires juvéniles (AOAJ) chez des chevaux de races françaises âgés de 3 ans : présentation globale des résultats sur 761 sujets. *Bulletin de la société vétérinaire pratique en France* 81: 53-70.
- Denoix, J M. 1990. Sémiologie radiographique générale des articulations. *Pratique Vétérinaire Equine* 22: 14-27.
- Desforges, M et Sibley, C P. 2010. Placental nutrient supply and fetal growth. *The International journal of developmental biology* 54: 377-390.
- Dik, K J, Enzerink, E et van Weeren, P R. 1999. Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months. *Equine veterinary journal. Supplement* : 9-15.
- Dobbs, T N, Foote, C E, Cawdell-Smith, A J, Anderson, D L, Boston, R C et Bryden, W L. 2012. Glucose and insulin dynamics in mares and their foals. In: *Australasian Equine Science Symposium, Gold Coast, QLD*. p 56.
- Doherty, A S, Mann, M R, Tremblay, K D, Bartolomei, M S et Schultz, R M. 2000. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biology of reproduction* 62: 1526-1535.

- Donabedian, M, Fleurance, G, Perona, G, Robert, C, Lepage, O, Trillaud-Geyl, C et al. 2006. Effect of fast vs. moderate growth rate related to nutrient intake on developmental orthopaedic disease in the horse. *Animal research* 55: 471-486.
- Donabedian, M, van Weeren, P R, Perona, G, Fleurance, G, Robert, C, Leger, S et al. 2008. Early changes in biomarkers of skeletal metabolism and their association to the occurrence of osteochondrosis (OC) in the horse. *Equine veterinary journal* 40: 253-259.
- Donaldson, M T, Jorgensen, A J et Beech, J. 2004. Evaluation of suspected pituitary pars intermedia dysfunction in horses with laminitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224: 1123-1127.
- Donaldson, M T, McDonnell, S M, Schanbacher, B J, Lamb, S V, McFarlane, D et Beech, J. 2005. Variation in plasma adrenocorticotrophic hormone concentration and dexamethasone suppression test results with season, age, and sex in healthy ponies and horses. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 19: 217-222.
- Donaldson, W L, Oriol, J G, Pelkaus, C L et Antczak, D F. 1994. Paternal and maternal major histocompatibility complex class I antigens are expressed co-dominantly by equine trophoblast. *Placenta* 15: 123-135.
- Donaldson, W L, Oriol, J G, Plavin, A et Antczak, D F. 1992. Developmental regulation of class I major histocompatibility complex antigen expression by equine trophoblastic cells. *Differentiation; research in biological diversity* 52: 69-78.
- Donaldson, W L, Zhang, C H, Oriol, J G et Antczak, D F. 1990. Invasive equine trophoblast expresses conventional class I major histocompatibility complex antigens. *Development* 110: 63-71.
- Donjacour, A, Liu, X, Lin, W, Simbulan, R et Rinaudo, P F. 2014. In vitro fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model. *Biology of reproduction* 90: 80.
- Doreau, M et Boulot, S. 1989a. Methods of measurement of milk yield and composition in nursing mares: a review. *Lait* 69: 159-171.
- Doreau, M et Boulot, S. 1989a. Methods of measurement of milk yield and composition in nursing mares: a review. *Lait* 69: 159-171.
- Doreau, M et Boulot, S. 1989b. Recent knowledge on mare milk production: a review. *Livestock production science* 22: 213-235.
- Doreau, M et Boulot, S. 1989b. Recent knowledge on mare milk production: a review. *Livestock production science* 22: 213-235.
- Doreau, M, Boulot, S, Barlet, J P et Patureau-Mirand, P. 1990. Yield and composition of milk from lactating mares: effect of lactation stage and individual differences. *The Journal of dairy research* 57: 449-454.
- Doreau, M, Boulot, S, Bauchart, D, Barlet, J P et Martin-Rosset, W. 1992. Voluntary intake, milk production and plasma metabolites in nursing mares fed two different diets. *The Journal of nutrition* 122: 992-999.

- Doreau, M, Boulot, S, Martin-Rosset, W et Dubroeuq, H. 1988a. Après le poulinage, peut-on alimenter les juments avec de faibles quantités d'aliments concentrés? In: 14ème journée d'étude du CEREOPA, Paris. p 103-114.
- Doreau, M, Boulot, S, Martin-Rosset, W et Robelin, J. 1986. Relationship between nutrient intake, growth and body composition of the nursing foal. *Reproduction, nutrition, development* 26: 683-690.
- Doreau, M, Boulot, S, Martin-Rosset, W et Robelin, J. 1986. Relationship between nutrient intake, growth and body composition of the nursing foal. *Reproduction, nutrition, development* 26: 683-690.
- Doreau, M, Bruhat, J P et Martin-Rosset, W. 1988b. Effets du niveau des apports azotés chez la jument en début de lactation. *Annales de zootechnie* 37: 21-30.
- Doreau, M, Martin-Rosset, W et Boulot, S. 1988c. Energy requirements and the feeding of mares during lactation: a review. *Livestock production science* 23: 53-68.
- Doreau, M, Martin-Rosset, W et Dubroeuq, H. 1982. Production laitière de la jument. Liaison avec la croissance du poulain. In: 8ème journée d'étude du CEREOPA, Paris. p 88-100.
- Doreau, M. 1994. Le lait de jument et sa production : particularités et facteurs de variation. *Lait* 74: 401-418.
- Doreau, M. 1994. Le lait de jument et sa production : particularités et facteurs de variation. *Lait* 74: 401-418.
- Doyon, C, Drouin, G, Trudeau, V L et Moon, T W. 2001. Molecular evolution of leptin. *General and comparative endocrinology* 124: 188-198.
- Driessler, F et Baldock, P A. 2010. Hypothalamic regulation of bone. *Journal of molecular endocrinology* 45: 175-181.
- Ducy, P, Amling, M, Takeda, S, Priemel, M, Schilling, A F, Beil, F T et al. 2000. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100: 197-207.
- Dunn, G A et Bale, T L. 2011. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology* 152: 2228-2236.
- Dupont, C, Cordier, A G, Junien, C, Mandon-Pepin, B, Levy, R et Chavatte-Palmer, P. 2012. Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology* 78: 1405-1414.
- Dupont, C, Ralliard-Rousseau, D, Tarrade, A, Faure, C, Dahirel, M, Sion, B et al. 2014. Impact of maternal hyperlipidic hypercholesterolaemic diet on male reproductive organs and testosterone concentration in rabbits. *Journal of developmental origins of health and disease* 5: 183-188.
- Ecker, D J, Stein, P, Xu, Z, Williams, C J, Kopf, G S, Bilker, W B et al. 2004. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 1595-1600.

- Ekman, S et Rodriguez-Martinez, H. 1991. Ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the normal and osteochondrotic joint cartilage of growing pigs. *Acta anatomica* 140: 26-33.
- Elefteriou, F, Ahn, J D, Takeda, S, Starbuck, M, Yang, X, Liu, X et al. 2005. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434: 514-520.
- Ellendorff, F et Schams, D. 1988. Characteristics of milk ejection, associated intramammary pressure changes and oxytocin release in the mare. *The Journal of endocrinology* 119: 219-227.
- Enders, A C, Lantz, K C, Schlafke, S et Liu, I K M. 1995. New cells and old vessels: the remodeling of the endometrial vasculature during establishment of the endometrial cups. *Biology of reproduction monograph series* 1: 181-190.
- Engelbregt, M J, van Weissenbruch, M M, Lips, P, van Lingen, A, Roos, J C et Delemarre-van de Waal, H A. 2004. Body composition and bone measurements in intra-uterine growth retarded and early postnatally undernourished male and female rats at the age of 6 months: comparison with puberty. *Bone* 34: 180-186.
- Ertelt, A, Barton, A K, Schmitz, R R et Gehlen, H. 2014. Metabolic syndrome: is equine disease comparable to what we know in humans? *Endocrine connections* 3: R81-93.
- Ewart, J C. 1915. Studies on the development of the horse. I. The development during the third week. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 51: 287-329.
- Faje, A T, Fazeli, P K, Miller, K K, Katzman, D K, Ebrahimi, S, Lee, H et al. 2014. Fracture risk and areal bone mineral density in adolescent females with anorexia nervosa. *The International journal of eating disorders* 47: 458-466.
- Farese, R V, Sajan, M P et Standaert, M L. 2005. Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Experimental biology and medicine* 230: 593-605.
- Farese, R V, Sajan, M P, Yang, H, Li, P, Mastorides, S, Gower, W R, Jr. et al. 2007. Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes. *The Journal of clinical investigation* 117: 2289-2301.
- Farnum, C E et Wilsman, N J. 1989a. Cellular turnover at the chondro-osseous junction of growth plate cartilage: analysis by serial sections at the light microscopical level. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 7: 654-666.
- Farnum, C E et Wilsman, N J. 1989b. Condensation of hypertrophic chondrocytes at the chondro-osseous junction of growth plate cartilage in Yucatan swine: relationship to long bone growth. *The American journal of anatomy* 186: 346-358.
- Fernandez-Gonzalez, R, Moreira, P, Bilbao, A, Jimenez, A, Perez-Crespo, M, Ramirez, M A et al. 2004. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 5880-5885.



- Ferrannini, E, Barrett, E J, Bevilacqua, S et DeFronzo, R A. 1983. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *The Journal of clinical investigation* 72: 1737-1747.
- Ferrari, S, Rizzoli, R, Slosman, D et Bonjour, J P. 1998. Familial resemblance for bone mineral mass is expressed before puberty. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83: 358-361.
- Firth, E C, Rogers, C W, Vickers, M, Kenyon, P R, Jenkinson, C M, Blair, H T et al. 2008. The bone-muscle ratio of fetal lambs is affected more by maternal nutrition during pregnancy than by maternal size. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 294: R1890-1894.
- Fitzgerald, B P, Reedy, S E, Sessions, D R, Vick, M M et Murphy, B A. 2003. Obesity disrupts the duration of the estrous cycle in the mare. *Journal of dairy science* 86: 102.
- Flade, J E. 1965. résultats de croisements réciproques et leurs conséquences. *Archiv Tierzucht* 8: 73-86.
- Flood, P F, Betteridge, K J et Diocee, M S. 1982. Transmission electron microscopy of horse embryos. *J Reprod Fert Suppl.* 32.
- Flood, P F, Betteridge, K J et Irvine, D S. 1979. Oestrogens and androgens in blastocoelic fluid and cultures of cells from equine conceptuses of 10-22 days gestation. *Journal of reproduction and fertility supplement* : 413-420.
- Forhead, A J, Broughton Pipkin, F et Fowden, A L. 2000. Effect of cortisol on blood pressure and the renin-angiotensin system in fetal sheep during late gestation. *The Journal of physiology* 526 Pt 1: 167-176.
- Forhead, A J, Ousey, J C, Allen, W R et Fowden, A L. 2004. Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *The Journal of endocrinology* 181: 459-467.
- Forhead, A J, Ousey, J C, Allen, W R et Fowden, A L. 2004. Postnatal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *The Journal of endocrinology* 181: 459-467.
- Fowden, A L, Barnes, R J, Comline, R S et Silver, M. 1980. Pancreatic beta-cell function in the fetal foal and mare. *Journal of Endocrinology* 87: 293-301.
- Fowden, A L, Comline, R S et Silver, M. 1984. Insulin secretion and carbohydrate metabolism during pregnancy in the mare. *Equine veterinary journal* 16: 239-246.
- Fowden, A L, Comline, R S et Silver, M. 1985. The effects of cortisol on the concentration of glycogen in different tissues in the chronically catheterized fetal pig. *Quarterly journal of experimental physiology* 70: 23-35.
- Fowden, A L, Forhead, A J et Ousey, J C. 2008. The Endocrinology of equine parturition. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 116: 393-403.
- Fowden, A L, Giussani, D A et Forhead, A J. 2006. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology* 21: 29-37.

- Fowden, A L, Li, J et Forhead, A J. 1998. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *The Proceedings of the Nutrition Society* 57: 113-122.
- Fradinho, M J, Correia, M J, Gracio, V, Bliebernicht, M, Farrim, A, Mateus, L et al. 2014. Effects of body condition and leptin on the reproductive performance of Lusitano mares on extensive systems. *Theriogenology* 81: 1214-1222.
- Franciosi, F, Lodde, V, Goudet, G, Duchamp, G, Deleuze, S, Douet, C et al. 2012. Changes in histone H4 acetylation during in vivo versus in vitro maturation of equine oocytes. *Molecular human reproduction* 18: 243-252.
- Frank, N, Elliott, S B, Brandt, L E et Keisler, D H. 2006. Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 228: 1383-1390.
- Frank, N, Geor, R J, Bailey, S R, Durham, A E, Johnson, P J et American College of Veterinary Internal, M. 2010. Equine metabolic syndrome. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 24: 467-475.
- Frank, N. 2006. Insulin resistance in horses. In: AAEP. p 51-54.
- Frayling, T M et Hattersley, A T. 2001. The role of genetic susceptibility in the association of low birth weight with type 2 diabetes. *British medical bulletin* 60: 89-101.
- French, K R et Pollitt, C C. 2004a. Equine laminitis: cleavage of laminin 5 associated with basement membrane dysadhesion. *Equine veterinary journal* 36: 242-247.
- French, K R et Pollitt, C C. 2004b. Equine laminitis: glucose deprivation and MMP activation induce dermo-epidermal separation in vitro. *Equine veterinary journal* 36: 261-266.
- Frisbie, D D, Al-Sobayil, F, Billingham, R C, Kawcak, C E et McIlwraith, C W. 2008. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 16: 1196-1204.
- Froscher, B G et Nagode, L A. 1979. Isoenzymes of equine alkaline phosphatase. *American journal of veterinary research* 40: 1514-1517.
- Fullston, T, Palmer, N O, Owens, J A, Mitchell, M, Bakos, H W et Lane, M. 2012. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Human reproduction* 27: 1391-1400.
- Funston, R N, Larson, D M et Vonnahme, K A. 2010. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: implications for beef cattle production. *Journal of animal science* 88: E205-215.
- Fyfe, E V. 2012. Biomarker assessment for detection of joint pathology in horses and evaluation of the nutritional supplement Steadfast Equine as a therapeutic, University of Missouri-Columbia.
- Gabory, A, Attig, L et Junien, C. 2011. Developmental programming and epigenetics. *The American journal of clinical nutrition* 94: 1943S-1952S.

- Gabory, A, Roseboom, T J, Moore, T, Moore, L G et Junien, C. 2013. Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biology of sex differences* 4: 5.
- Gafni, R I, Weise, M, Robrecht, D T, Meyers, J L, Barnes, K M, De-Levi, S et al. 2001. Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits. *Pediatric research* 50: 618-623.
- Ganjam, V K, Kenney, R M et Flickinger, G. 1975. Plasma progestagens in cyclic, pregnant and post-partum mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 441-447.
- Garcia, M C et Beech, J. 1986. Equine intravenous glucose tolerance test: glucose and insulin responses of healthy horses fed grain or hay and of horses with pituitary adenoma. *American journal of veterinary research* 47: 570-572.
- Garlinghouse, S E et Burrill, M J. 1999. Relationship of body condition score to completion rate during 160 km endurance races. *Equine veterinary journal. Supplement* : 591-595.
- Garnero, P, Aronstein, W S, Cohen, S B, Conaghan, P G, Cline, G A, Christiansen, C et al. 2008. Relationships between biochemical markers of bone and cartilage degradation with radiological progression in patients with knee osteoarthritis receiving risedronate: the Knee Osteoarthritis Structural Arthritis randomized clinical trial. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 16: 660-666.
- Gastal, M O, Gastal, E L, Torres, C A et Ginther, O J. 1998. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. *Theriogenology* 50: 989-999.
- Gatford, K L, Mohammad, S N, Harland, M L, De Blasio, M J, Fowden, A L, Robinson, J S et al. 2008. Impaired beta-cell function and inadequate compensatory increases in beta-cell mass after intrauterine growth restriction in sheep. *Endocrinology* 149: 5118-5127.
- Gauthier, K, Chassande, O, Plateroti, M, Roux, J P, Legrand, C, Pain, B et al. 1999. Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *The EMBO journal* 18: 623-631.
- Gee, E, Davies, M, Firth, E, Jeffcott, L, Fennessy, P et Mogg, T. 2007. Osteochondrosis and copper: histology of articular cartilage from foals out of copper supplemented and non-supplemented dams. *Vet J* 173: 109-117.
- Gee, E, Davies, M, Firth, E, Jeffcott, L, Fennessy, P et Mogg, T. 2007. Osteochondrosis and copper: histology of articular cartilage from foals out of copper supplemented and non-supplemented dams. *Vet J* 173: 109-117.
- Gentry, L R, Thompson, D L, Jr., Gentry, G T, Jr., Davis, K A, Godke, R A et Cartmill, J A. 2002. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *Journal of animal science* 80: 2695-2703.

- George, L A, Staniar, W B, Treiber, K H, Harris, P A et Geor, R J. 2009. Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition. *Domestic animal endocrinology* 37: 23-29.
- Gerber, H P, Vu, T H, Ryan, A M, Kowalski, J, Werb, Z et Ferrara, N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature medicine* 5: 623-628.
- Gevers, E F, van der Eerden, B C, Karperien, M, Raap, A K, Robinson, I C et Wit, J M. 2002. Localization and regulation of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in the rat growth plate. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17: 1408-1419.
- Gibbs, P G, Potter, G D, Blake, R W et McMullan, W C. 1982. Milk production of quarter horse mares during 150 days of lactation. *Journal of animal science* 54: 496-499.
- Gilbert, S F. 1997. *Developmental biology*. 5th ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MS, USA.
- Giles, S L, Rands, S A, Nicol, C J et Harris, P A. 2014. Obesity prevalence and associated risk factors in outdoor living domestic horses and ponies. *PeerJ* 2: e299.
- Gill, R J, Potter, G D, Kreider, J L, Schelling, G T et Jenkins, W L. 1983. Postpartum reproductive performance of mares fed various levels of protein. In: 8th equine nutrition and physiology symposium, Kentucky University. p 311-316.
- Ginther, O J. 1983a. Fixation and orientation of the early equine conceptus. *Theriogenology* 19: 613-623.
- Ginther, O J. 1983b. Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* 19: 603-611.
- Ginther, O J. 1992a. Embryology and placentation. In: O J Ginther (ed.) *Reproductive biology of the mare*. . p 345-418. Equiservices, Cross-Plains, WI, USA.
- Ginther, O J. 1992b. *Reproductive biology of the mare*. 2nd ed. Equiservices, Crossplains, WI, USA.
- Ginther, O J. 1998. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. In: AAEP. p 73-104.
- Giussani, D A, Forhead, A J, Gardner, D S, Fletcher, A J, Allen, W R et Fowden, A L. 2003. Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *The Journal of physiology* 547: 67-76.
- Giussani, D A, Forhead, A J, Gardner, D S, Fletcher, A J, Allen, W R et Fowden, A L. 2003. Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *The Journal of physiology* 547: 67-76.
- Glade, M J et Belling, T H, Jr. 1984. Growth plate cartilage metabolism, morphology and biochemical composition in over- and underfed horses. *Growth* 48: 473-482.
- Glade, M J et Belling, T H. 1986. A dietary etiology for osteochondrotic cartilage. *Journal of equine veterinary science* 6: 151-155.
- Glade, M J et Belling, T H. 1986. A dietary etiology for osteochondrotic cartilage. *Journal of equine veterinary science* 6: 151-155.

- Glade, M J et Reimers, T J. 1985. Effects of dietary energy supply on serum thyroxine, tri-iodothyronine and insulin concentrations in young horses. *The Journal of endocrinology* 104: 93-98.
- Glade, M J et Reimers, T J. 1985. Effects of dietary energy supply on serum thyroxine, tri-iodothyronine and insulin concentrations in young horses. *The Journal of endocrinology* 104: 93-98.
- Glade, M J, Gupta, S et Reimers, T J. 1984. Hormonal responses to high and low planes of nutrition in weanling thoroughbreds. *Journal of animal science* 59: 658-665.
- Glade, M J, Gupta, S et Reimers, T J. 1984. Hormonal responses to high and low planes of nutrition in weanling thoroughbreds. *Journal of animal science* 59: 658-665.
- Gluckman, P D et Hanson, M A. 2004. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 9: 419-425.
- Goater, L E, Meacham, T N, Gwazdauskas, F C et Fontenot, J P. 1981. The effect of feeding excess energy to mares in late lactation. In: 7th equine nutrition and physiology symposium, Virginia state University, VA. p 111-115.
- Goater, L E, Meacham, T N, Gwazdauskas, F C et Fontenot, J P. 1981. The effect of feeding excess energy to mares in late lactation. In: 7th equine nutrition and physiology symposium, Virginia state University, VA. p 111-115.
- Godfrey, K M. 2002. The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta* 23 Supplement 1 A: S20-27.
- Godfrey, K, Walker-Bone, K, Robinson, S, Taylor, P, Shore, S, Wheeler, T et al. 2001. Neonatal bone mass: influence of parental birthweight, maternal smoking, body composition, and activity during pregnancy. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16: 1694-1703.
- Goff, A K, Pontbriand, D et Sirois, J. 1987. Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13,14-dihydro prostaglandin F-2 alpha during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 35: 253-260.
- Gonzalez-Bulnes, A, Astiz, S, Ovilo, C, Lopez-Bote, C J, Sanchez-Sanchez, R, Perez-Solana, M et al. 2014. Adiposity and lipids profile in swine with leptin resistance and transgenerational programming. *The Journal of endocrinology*.
- Gordon, M E et McKeever, K H. 2005. Diurnal variation of ghrelin, leptin, and adiponectin in Standardbred mares. *Journal of animal science* 83: 2365-2371.
- Gosden, R, Trasler, J, Lucifero, D et Faddy, M. 2003. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* 361: 1975-1977.
- Gothe, S, Wang, Z, Ng, L, Kindblom, J M, Barros, A C, Ohlsson, C et al. 1999. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes & development* 13: 1329-1341.
- Gouveia, C H, Schultz, J J, Bianco, A C et Brent, G A. 2001. Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *The Journal of endocrinology* 170: 667-675.

- Green, D A. 1969. A study of growth rate in thoroughbred foals. *The British veterinary journal* 125: 539-546.
- Grunig, G, Triplett, L, Canady, L K, Allen, W R et Antczak, D F. 1995. The maternal leucocyte response to the endometrial cups in horses is correlated with the developmental stages of the invasive trophoblast cells. *Placenta* 16: 539-559.
- Gunn, H M. 1975. Adaptations of skeletal muscle that favour athletic ability. *New Zealand veterinary journal* 23: 249-254.
- Gygax, A P, Ganjam, V K et Kenney, R M. 1979. Clinical, microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 571-578.
- Hales, C N et Barker, D J. 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35: 595-601.
- Hales, C N et Barker, D J. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *British medical bulletin* 60: 5-20.
- Hales, C N, Barker, D J, Clark, P M, Cox, L J, Fall, C, Osmond, C et al. 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *Bmj* 303: 1019-1022.
- Hales, C N, Desai, M et Ozanne, S E. 1997. The Thrifty Phenotype hypothesis: how does it look after 5 years? *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 14: 189-195.
- Haluska, G J et Currie, W B. 1988. Variation in plasma concentrations of oestradiol-17 beta and their relationship to those of progesterone, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F-2 alpha and oxytocin across pregnancy and at parturition in pony mares. *Journal of reproduction and fertility* 84: 635-646.
- Hamon, M, Clarke, S W, Houghton, E, Fowden, A L, Silver, M, Rosedale, P D et al. 1991. Production of 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone during late pregnancy in the mare. *Journal of reproduction and fertility supplement* 44: 529-535.
- Han, X, Fowden, A L, Silver, M, Holdstock, N, McGladdery, A J, Ousey, J C et al. 1995. Immunohistochemical localisation of steroidogenic enzymes and phenylethanolamine-N-methyl-transferase (PNMT) in the adrenal gland of the fetal and newborn foal. *Equine veterinary journal* 27: 140-146.
- Hank, A M, Hoffmann, W E, Sanecki, R K, Schaeffer, D J et Dorner, J L. 1993. Quantitative determination of equine alkaline phosphatase isoenzymes in foal and adult serum. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 7: 20-24.
- Hanson, M A et Gluckman, P D. 2011. Developmental origins of health and disease: moving from biological concepts to interventions and policy. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 115 Suppl 1: S3-5.
- Hanson, M, Godfrey, K M, Lillycrop, K A, Burdge, G C et Gluckman, P D. 2011. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical

- considerations and epigenetic mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology* 106: 272-280.
- Harding, J E et Johnston, B M. 1995. Nutrition and fetal growth. *Reproduction, fertility, and development* 7: 539-547.
- Harker, I J, Harris, P A et Barfoot, C F. 2011. The body condition score of leisure horses competing at an unaffiliated championship in the UK. *Journal of equine veterinary science* 31: 253-254.
- Harris, R B. 1998. Acute and chronic effects of leptin on glucose utilization in lean mice. *Biochemical and biophysical research communications* 245: 502-509.
- Heap, R B, Hamon, M et Allen, W R. 1982. Studies on oestrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 32: 343-352.
- Heidler, B, Parvizi, N, Sauerwein, H, Bruckmaier, R M, Heintges, U, Aurich, J E et al. 2003. Effects of lactation on metabolic and reproductive hormones in Lipizzaner mares. *Domestic animal endocrinology* 25: 47-59.
- Heird, J C. 1973. Growth parameters in the quarter horse. In: 3rd Equine nutrition and physiology symposium, University of Florida. p 81-92.
- Henneke, D R, Potter, G D et Kreider, J L. 1981. Rebreding efficiency in mares fed different levels of energy during late gestation. In: 7th equine nutrition and physiology symposium Virginia State University, VA. p 101-104.
- Henneke, D R, Potter, G D et Kreider, J L. 1984. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology* 21: 897-909.
- Henson, F M, Davenport, C, Butler, L, Moran, I, Shingleton, W D, Jeffcott, L B et al. 1997. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine veterinary journal* 29: 441-447.
- Henson, F M, Davenport, C, Butler, L, Moran, I, Shingleton, W D, Jeffcott, L B et al. 1997. Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine veterinary journal* 29: 441-447.
- Henson, F M, Davies, M E, Skepper, J N et Jeffcott, L B. 1995. Localisation of alkaline phosphatase in equine growth cartilage. *Journal of anatomy* 187 ( Pt 1): 151-159.
- Hernandez, C J, Beaupre, G S et Carter, D R. 2003. A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 14: 843-847.
- Hershman, L et Douglas, R H. 1979. The critical period for the maternal recognition of pregnancy in pony mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 395-401.
- Hess, T M, Kronfeld, D S, Treiber, K H, Byrd, B M, Staniar, W B et Splan, R K. 2005. Laminitic metabolic profile in genetically predisposed ponies involves exaggerated

- compensated insulin resistance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89: 431.
- Heugebaert, S, Trillaud-Geyl, C, Dubroeuq, H, Arnaud, G, Valette, J P, Agabriel, J et al. 2009. Modélisation de la croissance des poulains : premières étapes cers les nouvelles recommandations alimentaires. In: 36ème Journée de la recherche équine, Paris
- Heyma, P et Larkins, R G. 1982. Glucocorticoids decrease in conversion of thyroxine into 3, 5, 3'-tri-iodothyronine by isolated rat renal tubules. *Clinical science* 62: 215-220.
- Hill, R A, Connor, E E, Poulos, S P, Welsh, T H et Gabler, N K. 2010. Growth and development symposium: fetal programming in animal agriculture. *Journal of animal science* 88: E38-39.
- Hinckley, K A et Henderson, I W. 1996. The epidemiology of equine laminitis in the UK
- Hintz, H F, Schryver, H F et Lowe, J E. 1971. Comparison of a blend of milk products and linseed meal as protein supplements for young growing horses. *Journal of animal science* 33: 1274-1277.
- Hintz, H F. 1978. Growth rate of horses. In: 24th Annual convention of the American association of equine practitioners. p 455-459.
- Hoffman, R M, Boston, R C, Stefanovski, D, Kronfeld, D S et Harris, P A. 2003. Obesity and diet affect glucose dynamics and insulin sensitivity in Thoroughbred geldings. *Journal of animal science* 81: 2333-2342.
- Hofman, P L, Cutfield, W S, Robinson, E M, Bergman, R N, Menon, R K, Sperling, M A et al. 1997. Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82: 402-406.
- Holleman, D F, White, R G et Luick, J R. 1975. New isotope methods for estimating milk intake and yield. *Journal of Dairy Science* 58: 1814-1821.
- Holtan, D W, Houghton, E, Silver, M, Fowden, A L, Ousey, J et Rosedale, P D. 1991. Plasma progestagens in the mare, fetus and newborn foal. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 44: 517-528.
- Holtan, D W, Nett, T M et Estergreen, V L. 1975. Plasma progestagens in pregnant mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 419-424.
- Holtan, D W, Squires, E L, Lapin, D R et Ginther, O J. 1979. Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. *Journal of reproduction and fertility supplement* 27: 457-463.
- Hotamisligil, G S. 1999a. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 107: 119-125.
- Hotamisligil, G S. 1999b. The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *Journal of internal medicine* 245: 621-625.
- Howell, C E et Rollins, W C. 1951. Environmental sources of variation in the gestation length of the horse. *Journal of animal science* 10: 789-796.
- Howell, C E et Rollins, W C. 1951. Environmental sources of variation in the gestation length of the horse. *Journal of animal science* 10: 789-796.



- Huising, M O, Geven, E J, Kruiswijk, C P, Nabuurs, S B, Stolte, E H, Spanings, F A et al. 2006. Increased leptin expression in common Carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology* 147: 5786-5797.
- Hunziker, E B, Wagner, J et Zapf, J. 1994. Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *The Journal of clinical investigation* 93: 1078-1086.
- Hurtig, M, Green, S L, Dobson, H, Mikuni-Takagaki, Y et Choi, J. 1993. Correlative study of defective cartilage and bone growth in foals fed a low-copper diet. *Equine veterinary journal* 25: 66-73.
- IDF. 2014. IDF worldwide definition of the metabolic syndrome. <http://www.idf.org/metabolic-syndrome> Accessed 20/08/2014 2014.
- IETS. 2013. Embryo transfer newsletter, International Embryo Transfer Society.
- IFCE. 2014. Chiffres et statistiques de la filière équine en France. [http://statscheval.haras-nationaux.fr/core/zone\\_menus.php?zone=229&r=1317](http://statscheval.haras-nationaux.fr/core/zone_menus.php?zone=229&r=1317) Accessed 09/07/2014.
- Ioannou, C, Javaid, M K, Mahon, P, Yaqub, M K, Harvey, N C, Godfrey, K M et al. 2012. The effect of maternal vitamin D concentration on fetal bone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97: E2070-2077.
- IOF. 2014. Facts and statistics. <http://www.iofbonehealth.org/facts-statistics> Accessed 12/07/2014.
- Isaksson, O G, Jansson, J O et Gause, I A. 1982. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216: 1237-1239.
- Isaksson, O G, Lindahl, A, Nilsson, A et Isgaard, J. 1987. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocrine reviews* 8: 426-438.
- Isgaard, J, Moller, C, Isaksson, O G, Nilsson, A, Mathews, L S et Norstedt, G. 1988. Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone. *Endocrinology* 122: 1515-1520.
- Itagane, Y, Inada, H, Fujita, K et Isshiki, G. 1991. Interactions between steroid hormones and insulin-like growth factor-I in rabbit chondrocytes. *Endocrinology* 128: 1419-1424.
- Jackson, B F, Goodship, A E, Eastell, R et Price, J S. 2003. Evaluation of serum concentrations of biochemical markers of bone metabolism and insulin-like growth factor I associated with treadmill exercise in young horses. *American journal of veterinary research* 64: 1549-1556.
- Jacquet, S, Robert, C, Valette, J P et Denoix, J M. 2013. Evolution of radiological findings detected in the limbs of 321 young horses between the ages of 6 and 18 months. *Vet J* 197: 58-64.
- Jaeschke, G. 1975. Routine determination of free hydroxyproline in horse serum methods and normal values. *Zentralblatt für Veterinarmedecin A* 22: 89-101.
- Jammes, H, Junien, C et Chavatte-Palmer, P. 2011. Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. *Reproduction, fertility, and development* 23: 64-74.

- Javaid, M K, Crozier, S R, Harvey, N C, Gale, C R, Dennison, E M, Boucher, B J et al. 2006a. Maternal vitamin D status during pregnancy and childhood bone mass at age 9 years: a longitudinal study. *Lancet* 367: 36-43.
- Javaid, M K, Eriksson, J G, Kajantie, E, Forsen, T, Osmond, C, Barker, D J et al. 2011. Growth in childhood predicts hip fracture risk in later life. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 22: 69-73.
- Javaid, M K, Lekamwasam, S, Clark, J, Dennison, E M, Syddall, H E, Loveridge, N et al. 2006b. Infant growth influences proximal femoral geometry in adulthood. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21: 508-512.
- Jeffcott, L B et Henson, F M. 1998. Studies on growth cartilage in the horse and their application to aetiopathogenesis of dyschondroplasia (Osteochondrosis). *Veterinary journal* 156: 177-192.
- Jeffcott, L B et Rosedale, P D. 1979. A radiographic study of the fetus in late pregnancy and during foaling. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 563-569.
- Jeffcott, L B, Field, J R, McLean, J G et O'Dea, K. 1986. Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. *Equine veterinary journal* 18: 97-101.
- Jeffcott, L B, Field, J R, McLean, J G et O'Dea, K. 1986. Glucose tolerance and insulin sensitivity in ponies and Standardbred horses. *Equine veterinary journal* 18: 97-101.
- Jeffcott, L B. 1971. Duration of permeability of the intestine to macromolecules in the newly-born foal. *The Veterinary record* 88: 340-341.
- Jeffcott, L B. 1974a. Studies on passive immunity in the foal. 1. Gamma-globulin and antibody variations associated with the maternal transfer of immunity and the onset of active immunity. *Journal of comparative pathology* 84: 93-101.
- Jeffcott, L B. 1974b. Studies on passive immunity in the foal. II. The absorption of 125I-labelled PVP (polyvinyl pyrrolidone) by the neonatal intestine. *Journal of comparative pathology* 84: 279-289.
- Jensen, C B, Storgaard, H, Dela, F, Holst, J J, Madsbad, S et Vaag, A A. 2002. Early differential defects of insulin secretion and action in 19-year-old caucasian men who had low birth weight. *Diabetes* 51: 1271-1280.
- Johnson, P J, Wiedmeyer, C E, Messer, N T et Ganjam, V K. 2009. Medical implications of obesity in horses--lessons for human obesity. *Journal of diabetes science and technology* 3: 163-174.
- Johnson, P J. 2002. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 18: 271-293.
- Jones, H N, Powell, T L et Jansson, T. 2007. Regulation of placental nutrient transport--a review. *Placenta* 28: 763-774.
- Jordan, R M. 1979. A note on the energy requirements for lactation of pony mares. In: 6th equine nutrition and physiology symposium. p 27-32.

- Juan, C C, Shen, Y W, Chien, Y, Lin, Y J, Chang, S F et Ho, L T. 2004. Insulin infusion induces endothelin-1-dependent hypertension in rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 287: E948-954.
- Kaati, G, Bygren, L O, Pembrey, M et Sjostrom, M. 2007. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity. *European journal of human genetics* : EJHG 15: 784-790.
- Kahn, C R. 1978. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism: clinical and experimental* 27: 1893-1902.
- Kajantie, E. 2008. Early-life events. Effects on aging. *Hormones* 7: 101-113.
- Kaplan, N M. 1989. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of internal medicine* 149: 1514-1520.
- Karsenty, G et Oury, F. 2010. The central regulation of bone mass, the first link between bone remodeling and energy metabolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95: 4795-4801.
- Karsenty, G. 1999. The genetic transformation of bone biology. *Genes & development* 13: 3037-3051.
- Karsenty, G. 2001. Contrôle central de la formation osseuse. *Médecine/sciences* 17: 1270-1275.
- Katila, T. 2011. Maternal recognition of pregnancy in the horse. *Pferdeheilkunde* 27: 261-264.
- Ke, X, Lei, Q, James, S J, Kelleher, S L, Melnyk, S, Jernigan, S et al. 2006. Uteroplacental insufficiency affects epigenetic determinants of chromatin structure in brains of neonatal and juvenile IUGR rats. *Physiological genomics* 25: 16-28.
- Kearns, C F, McKeever, K H, Kumagai, K et Abe, T. 2002. Fat-free mass is related to one-mile race performance in elite standardbred horses. *Vet J* 163: 260-266.
- Kearns, C F, McKeever, K H, Roegner, V, Brady, S M et Malinowski, K. 2006. Adiponectin and leptin are related to fat mass in horses. *Vet J* 172: 460-465.
- Kember, N F. 1971. Cell population kinetics of bone growth: the first ten years of autoradiographic studies with tritiated thymidine. *Clinical orthopaedics and related research* 76: 213-230.
- Kennedy, J, Baris, C, Hoyland, J A, Selby, P L, Freemont, A J et Braidman, I P. 1999. Immunofluorescent localization of estrogen receptor-alpha in growth plates of rabbits, but not in rats, at sexual maturity. *Bone* 24: 9-16.
- Kerjean, A, Couvert, P, Heams, T, Chalas, C, Poirier, K, Chelly, J et al. 2003. In vitro follicular growth affects oocyte imprinting establishment in mice. *European journal of human genetics* : EJHG 11: 493-496.
- Khan, I Y, Dekou, V, Douglas, G, Jensen, R, Hanson, M A, Poston, L et al. 2005. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288: R127-133.

- Kindblom, J M, Gothe, S, Forrest, D, Tornell, J, Tornell, J, Vennstrom, B et al. 2001. GH substitution reverses the growth phenotype but not the defective ossification in thyroid hormone receptor alpha 1-/-beta-/- mice. *The Journal of endocrinology* 171: 15-22.
- Kirsch, T, Harrison, G, Golub, E E et Nah, H D. 2000. The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *The Journal of biological chemistry* 275: 35577-35583.
- Knight, B S, Pennell, C E, Adamson, S L et Lye, S J. 2007. The impact of murine strain and sex on postnatal development after maternal dietary restriction during pregnancy. *The Journal of physiology* 581: 873-881.
- Knight, D A, Weisbrode, S E, Schmall, L M, Reed, S M, Gabel, A A, Bramlage, L R et al. 1990. The effects of copper supplementation on the prevalence of cartilage lesions in foals. *Equine veterinary journal* 22: 426-432.
- Koenen, E P C, Aldridge, L.I., Philipsson, J. 2004. An overview of breeding objectives for warmblood sport horses. *Livestock Science* 88: 77-84.
- Kohn, C W, Knight, D, Hueston, W, Jacobs, R et Reed, S M. 1989. Colostral and serum IgG, IgA, and IgM concentrations in Standardbred mares and their foals at parturition. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195: 64-68.
- Kolka, C M, Rattigan, S, Richards, S et Clark, M G. 2005. Metabolic and vascular actions of endothelin-1 are inhibited by insulin-mediated vasodilation in perfused rat hindlimb muscle. *British journal of pharmacology* 145: 992-1000.
- Kota, S K et Feil, R. 2010. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Developmental cell* 19: 675-686.
- Kristensen, P, Judge, M E, Thim, L, Ribel, U, Christjansen, K N, Wulff, B S et al. 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76.
- Krogh-Madsen, R, Moller, K, Dela, F, Kronborg, G, Jauffred, S et Pedersen, B K. 2004a. Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the response of IL-6, TNF-alpha, and FFAs to low-dose endotoxemia in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 286: E766-772.
- Krogh-Madsen, R, Plomgaard, P, Keller, P, Keller, C et Pedersen, B K. 2004b. Insulin stimulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous adipose tissue. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 286: E234-238.
- Kronfeld, D S, Treiber, K H, Hess, T M et Bosoton, R C. 2005. Insulin resistance in the horse: definition, detection and dietetics. *Journal of animal science* 83: E22-E31.
- Kuettner, K E. 1992. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clinical biochemistry* 25: 155-163.
- Kumarasamy, V, Mitchell, M D, Bloomfield, F H, Oliver, M H, Campbell, M E, Challis, J R et al. 2005. Effects of periconceptual undernutrition on the initiation of parturition in

- sheep. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288: R67-72.
- Kume, K, Satomura, K, Nishisho, S, Kitaoka, E, Yamanouchi, K, Tobiume, S et al. 2002. Potential role of leptin in endochondral ossification. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 50: 159-169.
- Kusec, V, Viridi, A S, Prince, R et Triffitt, J T. 1998. Localization of estrogen receptor-alpha in human and rabbit skeletal tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83: 2421-2428.
- Kyaw-Tanner, M et Pollitt, C C. 2004. Equine laminitis: increased transcription of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) occurs during the developmental phase. *Equine veterinary journal* 36: 221-225.
- Lagneaux, D, Duchamp, G et Palmer, E. 1988. La transplantation embryonnaire chez la jument. In: 14ème journée d'étude du CEREOPA, Paris, France. p 163-181.
- Lagneaux, D. 1999. Transferts d'embryons - aspects techniques. In: 25ème journée d'étude du CEREOPA, Paris, France. p 61-67.
- Lamothe, B, Baudry, A, Desbois, P, Lamotte, L, Bucchini, D, De Meyts, P et al. 1998. Genetic engineering in mice: impact on insulin signalling and action. *The Biochemical journal* 335 ( Pt 2): 193-204.
- Langlois, B, Blouin, C, Perrocheau, M et Chaffaux, S. 2006. Influence of osteochondrosis radiographic status at 16-18 months on racing performances in French trotters. *Pferdeheilkunde* 22: 461-464.
- Langlois, B. 1973. Caractères quantitatifs chez le cheval. Aspects génétiques. *Bulletin technique du Département de génétique animale (INRA)* 16: 135.
- Lanham, S A, Roberts, C, Hollingworth, T, Sreekumar, R, Elahi, M M, Cagampang, F R et al. 2010. Maternal high-fat diet: effects on offspring bone structure. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 21: 1703-1714.
- Larson, D M, Martin, J L, Adams, D C et Funston, R N. 2009. Winter grazing system and supplementation during late gestation influence performance of beef cows and steer progeny. *Journal of animal science* 87: 1147-1155.
- Lavoie, J P, Spensley, M S, Smith, B P et Mihalyi, J. 1989. Colostral volume and immunoglobulin G and M determinations in mares. *American journal of veterinary research* 50: 466-470.
- Lawlor, M J et Hopkins, S P. 1981. The influence of perinatal undernutrition of twin-bearing ewes on milk yields and lamb performance and the effects of postnatal nutrition on live weight gain and carcass composition. *The British journal of nutrition* 45: 579-586.
- Le Roith, D, Bondy, C, Yakar, S, Liu, J L et Butler, A. 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocrine reviews* 22: 53-74.

- Leadon, D P, Rossdale, P D, Jeffcott, L B et Allen, W R. 1982. A comparison of agents for inducing parturition in mares in the pre-viable and premature periods of gestation. *Journal of reproduction and fertility. Supplement 32*: 597-602.
- Leblanc, M M, Mays, M B et Sheerin, B R. 2001. Route of fetal infection in a model of ascending placentitis in the mare. *Pferdeheilkunde 17*: 689-689.
- LeBlanc, M. 2001. Update on passive transfer of immunoglobulins in the foal. *Pferdeheilkunde 17*: 662-665.
- Lecocq, M, Girard, C A, Fogarty, U, Beauchamp, G, Richard, H et Laverty, S. 2008. Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis? *Equine veterinary journal 40*: 442-454.
- Lee, E R, Lamplugh, L, Shepard, N L et Mort, J S. 1995. The septoclast, a cathepsin B-rich cell involved in the resorption of growth plate cartilage. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 43*: 525-536.
- Lee, N K et Karsenty, G. 2008. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM 19*: 161-166.
- Lee, N K, Sowa, H, Hinoi, E, Ferron, M, Ahn, J D, Confavreux, C et al. 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell 130*: 456-469.
- Leger, J, Levy-Marchal, C, Bloch, J, Pinet, A, Chevenne, D, Porquet, D et al. 1997. Reduced final height and indications for insulin resistance in 20 year olds born small for gestational age: regional cohort study. *Bmj 315*: 341-347.
- Leith, G S et Ginther, O J. 1984. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology 22*: 401-408.
- Lennard, S N, Gerstenberg, C, Allen, W R et Stewart, F. 1998. Expression of epidermal growth factor and its receptor in equine placental tissues. *Journal of reproduction and fertility 112*: 49-57.
- Lennard, S N, Stewart, F et Allen, W R. 1995. Insulin-like growth factor II gene expression in the fetus and placenta of the horse during the first half of gestation. *Journal of reproduction and fertility 103*: 169-179.
- Lepage, O M et Marcoux, M. 1991. Comparison of serum osteocalcin concentration and alkaline phosphatase activity as indicators of bone activity in a foal following surgery. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne 32*: 239-240.
- Lepage, O M, DesCoteaux, L, Marcoux, M et Tremblay, A. 1991. Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire 55*: 5-10.
- Lepage, O M, Marcoux, M et Tremblay, A. 1990. Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire 54*: 223-226.
- Lepeule, J. 2007. Epidémiologie descriptive et analytique des affections ostéoarticulaires juvéniles chez le cheval, Université de Rennes I, France.

- Leto, D et Saltiel, A R. 2012. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13: 383-396.
- Leveille, P, Tarrade, A, Dupont, C, Larcher, T, Dahirel, M, Poumerol, E et al. 2014. Maternal high-fat diet induces follicular atresia but does not affect fertility in adult rabbit offspring. *Journal of developmental origins of health and disease* 5: 88-97.
- Lewinson, D et Silbermann, M. 1992. Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption. *The Anatomical record* 233: 504-514.
- Lewinson, D, Bialik, G M et Hochberg, Z. 1994. Differential effects of hypothyroidism on the cartilage and the osteogenic process in the mandibular condyle: recovery by growth hormone and thyroxine. *Endocrinology* 135: 1504-1510.
- Lewis, L D. 1996. *Feeding and care of the horse*. 2nd edition ed. William and Wilkins, Philadelphia, USA.
- Lewis, L D. 1996. *Feeding and care of the horse*. 2nd edition ed. William and Wilkins, Philadelphia, USA.
- Li, E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature reviews. Genetics* 3: 662-673.
- Li, Y, Saldanha, S N et Tollefsbol, T O. 2014. Impact of epigenetic dietary compounds on transgenerational prevention of human diseases. *The AAPS journal* 16: 27-36.
- Liang, C, Oest, M E, Jones, J C et Prater, M R. 2009. Gestational high saturated fat diet alters C57BL/6 mouse perinatal skeletal formation. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 86: 362-369.
- Liggins, G C et Howie, R N. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50: 515-525.
- Liggins, G C. 1976. Adrenocortical-related maturational events in the fetus. *American journal of obstetrics and gynecology* 126: 931-941.
- Liggins, G C. 1994. The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reproduction, fertility, and development* 6: 141-150.
- Lindsay, R S, Dabelea, D, Roumain, J, Hanson, R L, Bennett, P H et Knowler, W C. 2000. Type 2 diabetes and low birth weight: the role of paternal inheritance in the association of low birth weight and diabetes. *Diabetes* 49: 445-449.
- Lithell, H O, McKeigue, P M, Berglund, L, Mohsen, R, Lithell, U B et Leon, D A. 1996. Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *Bmj* 312: 406-410.
- Longland, A C et Byrd, B M. 2006. Pasture nonstructural carbohydrates and equine laminitis. *The Journal of nutrition* 136: 2099S-2102S.
- Ludwig, M, Katalinic, A, Gross, S, Sutcliffe, A, Varon, R et Horsthemke, B. 2005. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *Journal of medical genetics* 42: 289-291.
- Luo, J M et Murphy, L J. 1989. Dexamethasone inhibits growth hormone induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) messenger ribonucleic acid (mRNA) in hypophysectomized

- rats and reduces IGF-I mRNA abundance in the intact rat. *Endocrinology* 125: 165-171.
- Macdonald, A A, Chavatte, P et Fowden, A L. 2000. Scanning electron microscopy of the microcotyledonary placenta of the horse (*Equus caballus*) in the latter half of gestation. *Placenta* 21: 565-574.
- Mack, S J, Jackson, B F, Dyson, P K, Verheyen, K L P et Price, J S. 2007. Evaluation of the C-terminal cross-linked telopeptide of type II collagen( CTX-II) as a potential cartilage biomarker for use in the horse. In: BEVA
- Mackie, E J, Tatarczuch, L et Mirams, M. 2011. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *The Journal of endocrinology* 211: 109-121.
- MacLennan, N K, James, S J, Melnyk, S, Piroozi, A, Jernigan, S, Hsu, J L et al. 2004. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiological genomics* 18: 43-50.
- Maenpaa, P E, Pirskanen, A et Koskinen, E. 1988. Biochemical indicators of bone formation in foals after transfer from pasture to stables for the winter months. *American journal of veterinary research* 49: 1990-1992.
- Magnusson, P, Degerblad, M, Saaf, M, Larsson, L et Thoren, M. 1997. Different responses of bone alkaline phosphatase isoforms during recombinant insulin-like growth factor-I (IGF-I) and during growth hormone therapy in adults with growth hormone deficiency. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12: 210-220.
- Maor, G, Segev, Y et Phillip, M. 1999. Testosterone stimulates insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I-receptor gene expression in the mandibular condyle--a model of endochondral ossification. *Endocrinology* 140: 1901-1910.
- Marcq, J, Lahaye, J et Cordiez, E. 1956. *Le cheval*. Librairie Agricole. La Maison Rustique, Paris, France.
- Market-Velker, B A, Fernandes, A D et Mann, M R. 2010. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. *Biology of reproduction* 83: 938-950.
- Martin, S. 2013. *Programmation foetale de la croissance osseuse et de l'ostéochondrose chez le poulain*, ONIRIS, France.
- Martin-Rosset, W et Jussiaux, M. 1977. Productions de poulains de boucherie. *Bulletin technique du CRZV de Theix (INRA)* 29: 13-21.
- Martin-Rosset, W, Boccard, R, Jussiaux, M, Robelin, J et Trillaud-Geyl, C. 1983. Croissance relative des différents tissus, organes et régions corporelles entre 12 et 30 mois chez le cheval de boucherie de différentes races lourdes. *Annales de zootechnie* 32: 153-174.
- Martin-Rosset, W, Boccard, R, Robelin, J et Jussiaux, M. 1980. Croissance relative des différents tissus et régions corporelles chez le poulain de la naissance à 30 mois. In: 6ème Journée de la Recherche Equine, Paris. p 59-70.



- Martin-Rosset, W. 1983. Particularités de la croissance et du développement du cheval. *Annales de zootechnie* 32: 109-130.
- Martin-Rosset, W. 2005. Growth and development in the equine. In: 4th European Workshop on Equine Nutrition. p 15-50.
- Martin-Rosset, W. 2012. Nutrition et alimentation des chevaux. Quae, France.
- Martin-Rosset, W. 2012. Nutrition et alimentation des chevaux. Quae, France.
- Mathias, S, Allen W R, Rezai, A, Jalali, G R, Underwood, J et Mowbray, J F. 1995. Maternal immunoglobulin on the equine placenta. *Biology of reproduction monograph series* 1: 201-207.
- Mayne, R. 1989. Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis and rheumatism* 32: 241-246.
- McCance, D R, Pettitt, D J, Hanson, R L, Jacobsson, L T, Knowler, W C et Bennett, P H. 1994. Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *Bmj* 308: 942-945.
- McCance, R A. 1976. Critical periods of growth. *The Proceedings of the Nutrition Society* 35: 309-313.
- McEvoy, T G, Robinson, J J et Sinclair, K D. 2001. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction* 122: 507-518.
- McEvoy, T G, Robinson, J J et Sinclair, K D. 2001. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction* 122: 507-518.
- McEvoy, T G, Sinclair, K D, Broadbent, P J, Goodhand, K L et Robinson, J J. 1998. Post-natal growth and development of Simmental calves derived from in vivo or in vitro embryos. *Reproduction, fertility, and development* 10: 459-464.
- McEvoy, T G, Sinclair, K D, Young, L E, Wilmut, I et Robinson, J J. 2000. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Human fertility* 3: 238-246.
- McIlwraith, C W. 2002. Adams' lameness in horses. p 459-644. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- McKinnon, A O et Voss, J. 1992. *Equine reproduction*. Wiley, John & Sons, Incorporated, USA.
- McKinnon, A O, Nobelius, A M, Hyland, J H et Vasey, J R. 1992. Ability of progestins to maintain pregnancy in the mare. *Australian equine veterinarian* 10: 142.
- McMillen, I C et Robinson, J S. 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological reviews* 85: 571-633.
- Meira, C, Ferreira, J C, Silva, E S M et Ignacia, F S. 2012. Developmental aspects of early pregnancy in mares. *Anim Reprod* 9: 166-172.
- Meliani, S, benallou, B, Abdelhadi, S A, Halbouche, M et Naceri, A. 2011. Environmental factors affecting gestation duration and time of foaling of pure bred Arabian mares in Algeria. *Asian journal of animal and veterinary advances* 6: 599-608.
- Meliani, S, benallou, B, Abdelhadi, S A, Halbouche, M et Naceri, A. 2011. Environmental factors affecting gestation duration and time of foaling of pure bred Arabian mares in Algeria. *Asian journal of animal and veterinary advances* 6: 599-608.

- Mephram, T B. 1987. Physiology of lactation
- Mericq, V, Ong, K K, Bazaes, R, Pena, V, Avila, A, Salazar, T et al. 2005. Longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion from birth to age three years in small- and appropriate-for-gestational-age children. *Diabetologia* 48: 2609-2614.
- Milinovich, G J, Burrell, P C, Pollitt, C C, Bouvet, A et Trott, D J. 2008a. *Streptococcus henryi* sp. nov. and *Streptococcus caballi* sp. nov., isolated from the hindgut of horses with oligofructose-induced laminitis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58: 262-266.
- Milinovich, G J, Burrell, P C, Pollitt, C C, Klieve, A V, Blackall, L L, Ouwerkerk, D et al. 2008b. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. *The ISME journal* 2: 1089-1100.
- Milinovich, G J, Trott, D J, Burrell, P C, Croser, E L, Al Jassim, R A, Morton, J M et al. 2007. Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environmental microbiology* 9: 2090-2100.
- Miura, M, Tanaka, K, Komatsu, Y, Suda, M, Yasoda, A, Sakuma, Y et al. 2002. Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17: 443-454.
- Mobasher, A, Critchlow, K, Clegg, P D, Carter, S D et Canessa, C M. 2004. Chronic equine laminitis is characterised by loss of GLUT1, GLUT4 and ENaC positive laminar keratinocytes. *Equine veterinary journal* 36: 248-254.
- Morgan, H D, Santos, F, Green, K, Dean, W et Reik, W. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics* 14 Spec No 1: R47-58.
- Morrone, M, De Matteis, R, Palumbo, C, Ferretti, M, Villa, I, Rubinacci, A et al. 2004. In vivo leptin expression in cartilage and bone cells of growing rats and adult humans. *Journal of anatomy* 205: 291-296.
- Moss, G E, Estergreen, V L, Becker, S R et D, G B. 1979. The source of 5 $\alpha$ -pregnanes that occur during gestation in mares. *Journal of reproduction and fertility supplement* 27: 511-519.
- Mostl, E. 1994. The horse feto-placental unit. *Experimental and clinical endocrinology* 102: 166-168.
- Muirhead, T, McClure, J T, Bourque, A et Pack, L. 2003. Osteochondrosis of the occipital condyles and atlanto-occipital dysplasia in a Belgian horse. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 44: 984-986.
- Muller, G, Ertl, J, Gerl, M et Preibisch, G. 1997. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 272: 10585-10593.
- Mungall, B A, Kyaw-Tanner, M et Pollitt, C C. 2001. In vitro evidence for a bacterial pathogenesis of equine laminitis. *Veterinary microbiology* 79: 209-223.

- Nagy, P, Duchamp, G, Chavatte-Palmer, P, Daels, P F et Guillaume, D. 2002. Induction of lactation in mares with a dopamine antagonist need ovarian hormones. *Theriogenology* 58: 853-856.
- Nagy, P, Huszenicza, G, Juhasz, J, Kulcsar, M, Solti, L, Reiczigel, J et al. 1998. Factors influencing ovarian activity and sexual behavior of postpartum mares under farm conditions. *Theriogenology* 50: 1109-1119.
- Nathanielsz, P W, Comline, R S, Silver, M et Paisey, R B. 1972. Cortisol metabolism in the fetal and neonatal sheep. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 16: Suppl 16:39-59.
- Nett, T M, Holtan, D W et Estergreen, V L. 1975. Levels of LH, prolactin and oestrogens in the serum of post-partum mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 201-206.
- Neuhaus, U. 1959. Milch und Milchgewinnung von Pferdestuten. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde* 73: 370-392.
- Neuschaefer, A, Bracher, V et Allen, W R. 1991. Prolactin secretion in lactating mares before and after treatment with bromocriptine. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 44: 551-559.
- Newsome, C A, Shiell, A W, Fall, C H, Phillips, D I, Shier, R et Law, C M. 2003. Is birth weight related to later glucose and insulin metabolism?--A systematic review. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 20: 339-348.
- Nilsson, A, Isgaard, J, Lindahl, A, Dahlstrom, A, Skottner, A et Isaksson, O G. 1986. Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science* 233: 571-574.
- Nilsson, L O, Boman, A, Savendahl, L, Grigelioniene, G, Ohlsson, C, Ritzen, E M et al. 1999. Demonstration of estrogen receptor-beta immunoreactivity in human growth plate cartilage. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84: 370-373.
- Nilsson, O et Baron, J. 2005. Impact of growth plate senescence on catch-up growth and epiphyseal fusion. *Pediatric nephrology* 20: 319-322.
- Nilsson, O, Abad, V, Chrysis, D, Ritzen, E M, Savendahl, L et Baron, J. 2002. Estrogen receptor-alpha and -beta are expressed throughout postnatal development in the rat and rabbit growth plate. *The Journal of endocrinology* 173: 407-414.
- Nilsson, O, Chrysis, D, Pajulo, O, Boman, A, Holst, M, Rubinstein, J et al. 2003. Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages. *The Journal of endocrinology* 177: 319-326.
- Nilsson, O, Marino, R, De Luca, F, Phillip, M et Baron, J. 2005a. Endocrine regulation of the growth plate. *Hormone research* 64: 157-165.
- Nilsson, O, Mitchum, R D, Jr., Schrier, L, Ferns, S P, Barnes, K M, Troendle, J F et al. 2005b. Growth plate senescence is associated with loss of DNA methylation. *The Journal of endocrinology* 186: 241-249.

- Nyirenda, M J, Welberg, L A et Seckl, J R. 2001. Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect or maternal influence? *The Journal of endocrinology* 170: 653-660.
- Oftedal, O T, Hintz, H F et Schryver, H F. 1983. Lactation in the horse: milk composition and intake by foals. *The Journal of nutrition* 113: 2096-2106.
- Oftedal, O T, Hintz, H F et Schryver, H F. 1983. Lactation in the horse: milk composition and intake by foals. *The Journal of nutrition* 113: 2096-2106.
- Oguri, N et Tsutsumi, Y. 1972. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *Journal of reproduction and fertility* 31: 187-195.
- Oguri, N et Tsutsumi, Y. 1974. Non-surgical egg transfer in mares. *Journal of reproduction and fertility* 41: 313-320.
- Ohlsson, C, Nilsson, A, Isaksson, O et Lindahl, A. 1992b. Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9826-9830.
- Ohlsson, C, Nilsson, A, Isaksson, O, Bentham, J et Lindahl, A. 1992a. Effects of tri-iodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *The Journal of endocrinology* 135: 115-123.
- Okubo, Y et Reddi, A H. 2003. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications* 306: 186-190.
- Oliver, H, Jameson, K A, Sayer, A A, Cooper, C, Dennison, E M et Hertfordshire Cohort Study, G. 2007. Growth in early life predicts bone strength in late adulthood: the Hertfordshire Cohort Study. *Bone* 41: 400-405.
- Olofsson, N E et Thomke, S. 1963. Raising experiments with young horses at Ultuna, 1952-1958. *Lantbrukshögskonlans meddelan* 1: 3-19.
- Olsson, N. 1952. Studies on growth and feed consumption in growing Belgian horses. *Kungl. Lantbrukshögskolan och statens lantbruksförsök meddelande* 49: 1-13.
- Olstad, K, Ytrehus, B, Ekman, S, Carlson, C S et Dolvik, N I. 2007. Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25: 1094-1105.
- Ong, K K, Petry, C J, Emmett, P M, Sandhu, M S, Kiess, W, Hales, C N et al. 2004. Insulin sensitivity and secretion in normal children related to size at birth, postnatal growth, and plasma insulin-like growth factor-I levels. *Diabetologia* 47: 1064-1070.
- Open University Press.
- Oriol, J G, Betteridge, K J, Clarke, A J et Sharom, F J. 1993. Mucin-like glycoproteins in the equine embryonic capsule. *Molecular reproduction and development* 34: 255-265.
- O'Sullivan, L, Combes, A N et Moritz, K M. 2012. Epigenetics and developmental programming of adult onset diseases. *Pediatric nephrology* 27: 2175-2182.

- Ott, E A, Asquith, R L, Feaster, J P et Martin, F G. 1979. Influence of protein level and quality on the growth and development of yearling foals. *Journal of animal science* 49: 620-628.
- Ousey, J C, Fowden, A L, Wilsher, S et Allen, W R. 2008. The effects of maternal health and body condition on the endocrine responses of neonatal foals. *Equine veterinary journal* 40: 673-679.
- Ousey, J C, Rossdale, P D, Fowden, A L, Palmer, L, Turnbull, C et Allen, W R. 2004. Effects of manipulating intrauterine growth on post natal adrenocortical development and other parameters of maturity in neonatal foals. *Equine veterinary journal* 36: 616-621.
- Ousey, J C, Rossdale, P D, Fowden, A L, Palmer, L, Turnbull, C et Allen, W R. 2004. Effects of manipulating intrauterine growth on post natal adrenocortical development and other parameters of maturity in neonatal foals. *Equine veterinary journal* 36: 616-621.
- Owens, J A, Gatford, K L, De Blasio, M J, Edwards, L J, McMillen, I C et Fowden, A L. 2007a. Restriction of placental growth in sheep impairs insulin secretion but not sensitivity before birth. *The Journal of physiology* 584: 935-949.
- Owens, J A, Thavaneswaran, P, De Blasio, M J, McMillen, I C, Robinson, J S et Gatford, K L. 2007b. Sex-specific effects of placental restriction on components of the metabolic syndrome in young adult sheep. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 292: E1879-1889.
- Oz, O K, Millsaps, R, Welch, R, Birch, J et Zerwekh, J E. 2001. Expression of aromatase in the human growth plate. *Journal of molecular endocrinology* 27: 249-253.
- Ozanne, S E et Hales, C N. 2002. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13: 368-373.
- Ozanne, S E et Hales, C N. 2004. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 427: 411-412.
- Pagan, J D et Hintz, H F. 1984. Digestible energy requirements of lactating pony mares. *The Cornell veterinarian* : 121-126.
- Pagan, J D, Geor, R J, Caddel, S E, Pryor, P B et Hoekstra, K E. 2001. The relationship between glycemic response and the incidence of OCD in thoroughbred weanlings: a field study. In: AAEP. p 322-325.
- Pagani, F, Francucci, C M et Moro, L. 2005. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *Journal of endocrinological investigation* 28: 8-13.
- Painter, R C, Roseboom, T J et Bleker, O P. 2005. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reproductive toxicology* 20: 345-352.
- Pallett, A L, Morton, N M, Cawthorne, M A et Emilsson, V. 1997. Leptin inhibits insulin secretion and reduces insulin mRNA levels in rat isolated pancreatic islets. *Biochemical and biophysical research communications* 238: 267-270.

- Park, J H, Stoffers, D A, Nicholls, R D et Simmons, R A. 2008. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *The Journal of clinical investigation* 118: 2316-2324.
- Pashen, R L et Allen, W R. 1979. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 499-509.
- Pashen, R L. 1984. Maternal and foetal endocrinology during late pregnancy and parturition in the mare. *Equine veterinary journal* 16: 233-238.
- Pass, M A, Pollitt, S et Pollitt, C C. 1998. Decreased glucose metabolism causes separation of hoof lamellae in vitro: a trigger for laminitis? *Equine veterinary journal. Supplement* : 133-138.
- Pearce, S G, Firth, E C, Grace, N D et Fennessy, P F. 1998a. Effect of copper supplementation on the evidence of developmental orthopaedic disease in pasture-fed New Zealand Thoroughbreds. *Equine veterinary journal* 30: 211-218.
- Pearce, S G, Firth, E C, Grace, N D et Fennessy, P F. 1998a. Effect of copper supplementation on the evidence of developmental orthopaedic disease in pasture-fed New Zealand Thoroughbreds. *Equine veterinary journal* 30: 211-218.
- Pearce, S G, Grace, N D, Firth, E C, Wichtel, J J, Holle, S A et Fennessy, P F. 1998b. Effect of copper supplementation on the copper status of pasture-fed young Thoroughbreds. *Equine veterinary journal* 30: 204-210.
- Pearce, S G, Grace, N D, Firth, E C, Wichtel, J J, Holle, S A et Fennessy, P F. 1998b. Effect of copper supplementation on the copper status of pasture-fed young Thoroughbreds. *Equine veterinary journal* 30: 204-210.
- Pearce, S G, Grace, N D, Wichtel, J J, Firth, E C et Fennessy, P F. 1998c. Effect of copper supplementation on copper status of pregnant mares and foals. *Equine veterinary journal* 30: 200-203.
- Pearce, S G, Grace, N D, Wichtel, J J, Firth, E C et Fennessy, P F. 1998c. Effect of copper supplementation on copper status of pregnant mares and foals. *Equine veterinary journal* 30: 200-203.
- Pearl, C A, Mason, H et Roser, J F. 2011. Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis. *Animal reproduction science* 125: 103-111.
- Pearson, R C, Hallowell, A L, Bayly, W M, Torbeck, R L et Perryman, L E. 1984. Times of appearance and disappearance of colostral IgG in the mare. *American journal of veterinary research* 45: 186-190.
- Pembrey, M E, Bygren, L O, Kaati, G, Edvinsson, S, Northstone, K, Sjöström, M et al. 2006. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *European journal of human genetics : EJHG* 14: 159-166.
- Perez, C C, Rodriguez, I, Mota, J, Dorado, J, Hidalgo, M, Felipe, M et al. 2003. Gestation length in Carthusian Spanishbred mares. *Livestock Science* 82: 181-187.

- Perez, C C, Rodriguez, I, Mota, J, Dorado, J, Hidalgo, M, Felipe, M et al. 2003. Gestation length in Carthusian Spanishbred mares. *Livestock Science* 82: 181-187.
- Perez, C, Fernandez-Galaz, C, Fernandez-Agullo, T, Arribas, C, Andres, A, Ros, M et al. 2004. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes* 53: 347-353.
- Perseghin, G, Petersen, K et Shulman, G I. 2003. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 27 Suppl 3: S6-11.
- Phillip, M, Maor, G, Assa, S, Silbergeld, A et Segev, Y. 2001. Testosterone stimulates growth of tibial epiphyseal growth plate and insulin-like growth factor-1 receptor abundance in hypophysectomized and castrated rats. *Endocrine* 16: 1-6.
- Phillips, D I, Barker, D J, Hales, C N, Hirst, S et Osmond, C. 1994. Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetologia* 37: 150-154.
- Pollitt, C C. 1996. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine veterinary journal* 28: 38-46.
- Pond, W G. 1973. Influence of maternal protein and energy nutrition during gestation on progeny performance in swine. *Journal of animal science* 36: 175-182.
- Pool-Anderson, K, Raub, R H et Warren, J A. 1994. Maternal influences on growth and development of full-sibling foals. *Journal of animal science* 72: 1661-1666.
- Poore, K R et Fowden, A L. 2002. The effect of birth weight on glucose tolerance in pigs at 3 and 12 months of age. *Diabetologia* 45: 1247-1254.
- Poore, K R et Fowden, A L. 2003. The effect of birth weight on hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in juvenile and adult pigs. *The Journal of physiology* 547: 107-116.
- Porter, R H, Duchamp, G, Nowak, R et Daels, P F. 2002. Induction of maternal behavior in non-parturient adoptive mares. *Physiology & behavior* 77: 151-154.
- Powell, S E et Aberle, E D. 1980. Effects of birth weight on growth and carcass composition of swine. *Journal of animal science* 50: 860-868.
- Price, J S, Jackson, B F, Gray, J A, Harris, P A, Wright, I M, Pfeiffer, D U et al. 2001. Biochemical markers of bone metabolism in growing thoroughbreds: a longitudinal study. *Research in veterinary science* 71: 37-44.
- Price, J S, Jackson, B, Eastell, R, Goodship, A E, Blumsohn, A, Wright, I et al. 1995. Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Equine veterinary journal* 27: 201-207.
- Pulse, R E, Baker, J P et Potter, G D. 1973. Protein requirements for growth of horses. In: 3rd Equine nutrition and physiology symposium, University of Florida (Gainesville). p 34-42.
- Rached, M T, Kode, A, Silva, B C, Jung, D Y, Gray, S, Ong, H et al. 2010. FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice. *The Journal of clinical investigation* 120: 357-368.

- Ralston, S L. 1996. Hyperglycemia/hyperinsulinemia after feeding a meal of grain to young horses with osteochondritis dissecans (OCD) lesions. *Pferdeheilkunde* 12: 320-322.
- Ravelli, A C, van der Meulen, J H, Michels, R P, Osmond, C, Barker, D J, Hales, C N et al. 1998. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351: 173-177.
- Ravelli, A C, van Der Meulen, J H, Osmond, C, Barker, D J et Bleker, O P. 1999. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *The American journal of clinical nutrition* 70: 811-816.
- Reed, M G, Howard, C V et GS, D E Y. 2010. One-stop stereology: the estimation of 3D parameters using isotropic rulers. *Journal of microscopy* 239: 54-65.
- Reik, W, Dean, W et Walter, J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093.
- Reik, W. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447: 425-432.
- Rejno, S et Stromberg, B. 1978. Osteochondrosis in the horse. II. Pathology. *Acta radiologica. Supplementum* 358: 153-178.
- Reynolds, L P et Caton, J S. 2012. Role of the pre- and post-natal environment in developmental programming of health and productivity. *Molecular and cellular endocrinology* 354: 54-59.
- Reynolds, L P, Borowicz, P P, Caton, J S, Vonnahme, K A, Luther, J S, Hammer, C J et al. 2010. Developmental programming: the concept, large animal models, and the key role of uteroplacental vascular development. *Journal of animal science* 88: E61-72.
- Rhind, S M, Rae, M T et Brooks, A N. 2001. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction* 122: 205-214.
- Ricard, A et Blouin, C. 2011. Genetic analysis of the longevity of French sport horses in jumping competition. *Journal of animal science* 89: 2988-2994.
- Rigby, S, Love, C, Carpenter, K, Varner, D et Blanchard, T. 1998. Use of prostaglandin E2 to ripen the cervix of the mare prior to induction of parturition. *Theriogenology* 50: 897-904.
- Rijnen, K E et van der Kolk, J H. 2003. Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies. *American journal of veterinary research* 64: 1260-1264.
- Rijnen, K E et van der Kolk, J H. 2003. Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies. *American journal of veterinary research* 64: 1260-1264.
- Riley, C B, Scott, W M, Caron, J P, Fretz, P B, Bailey, J V et Barber, S M. 1998. Osteochondritis dissecans and subchondral cystic lesions in draft horses: a retrospective study. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 39: 627-633.
- Rivera Del Alamo, M M, Reilas, T, Kindahl, H et Katila, T. 2008. Mechanisms behind intrauterine device-induced luteal persistence in mares. *Animal reproduction science* 107: 94-106.



- Rogers, C W, Bolwell, C.F., Gee, E.K. 2012. Proactive management of the equine athlete. *Animals* 2: 640-655.
- Rollins, W C et Howell, C E. 1951. Genetic sources of variation in the gestation length of the horse. *Journal of animal science* 10: 797-806.
- Rollins, W C et Howell, C E. 1951. Genetic sources of variation in the gestation length of the horse. *Journal of animal science* 10: 797-806.
- Romano, T, Wark, J D et Wlodek, M E. 2010. Calcium supplementation does not rescue the programmed adult bone deficits associated with perinatal growth restriction. *Bone* 47: 1054-1063.
- Roseboom, T J, van der Meulen, J H, Ravelli, A C, Osmond, C, Barker, D J et Bleker, O P. 2001. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Molecular and cellular endocrinology* 185: 93-98.
- Ross, M W et Dyson, S J. 2003. Diagnosis and management of osteochondrosis and osseous cyst-like lesions. In: M W Ross et S J Dyson (eds.) *Diagnosis and management of lameness in the horse*. p 549-554. Elsevier Saunders.
- Rossdale, P D et Ricketts, S W. 1983. *Gestation Equine Stud Farm Medicine*. p 165-219. Baillière Tindall, Eastbourne, UK.
- Rossdale, P D et Ricketts, S W. 1983. *Gestation Equine Stud Farm Medicine*. p 165-219. Baillière Tindall, Eastbourne, UK.
- Rossdale, P D et Silver, M. 1982. The concept of readiness for birth. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 32: 507-510.
- Rossdale, P D, Ousey, J C et Chavatte, P. 1997. Readiness for birth: an endocrinological duet between fetal foal and mare. *Equine veterinary journal. Supplement* : 96-99.
- Rossdale, P D, Ousey, J C, Cottrill, C M, Chavatte, P, Allen, W R et McGladdery, A J. 1991. Effects of placental pathology on maternal plasma progesterone and mammary secretion calcium concentrations and on neonatal adrenocortical function in the horse. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 44: 579-590.
- Rossdale, P D, Ousey, J C, Silver, M et Fowden, A. 1984. Studies on equine prematurity 6: Guidelines for assessment of foal maturity. *Equine veterinary journal* 16: 300-302.
- Rossdale, P D, Ousey, J.C. 2002. Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR. *Equine Veterinary Education* 14: 98-112.
- Rossdale, P D. 1985. Sir Frederick Hobday memorial lecture. Part 1: Practice, teaching and research--a common philosophy. Part 2: Concepts of critical care in the newborn foal. *Equine veterinary journal* 17: 343-353.
- Rossdale, P, Hopes, R, Wingfield Digby, N J et Offord, K. 1985. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Veterinary record* 116: 66-69.
- Rossdale, P, Silver, M, Comline, R S, Hall, L W et Nathanielsz, P W. 1973. Plasma cortisol in the foal during the late fetal and early neonatal period. *Research in veterinary science* 15: 395-397.
- Rouse, B T et Ingram, D G. 1970. The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk. *Immunology* 19: 901-907.

- Russell, S M et Spencer, E M. 1985. Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 116: 2563-2567.
- Saint-Dizier, M, Chopineau, M, Dupont, J et Combarnous, Y. 2004a. Expression of the full-length and alternatively spliced equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNAs in the primary corpus luteum and fetal gonads during pregnancy. *Reproduction* 128: 219-228.
- Saint-Dizier, M, Chopineau, M, Dupont, J, Daels, P F et Combarnous, Y. 2003. Expression and binding activity of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in the primary corpus luteum during early pregnancy in the mare. *Biology of reproduction* 69: 1743-1749.
- Saint-Dizier, M, Foulon-Gauze, F, Lecompte, F, Combarnous, Y et Chopineau, M. 2004b. Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor. *The Journal of endocrinology* 183: 551-559.
- Salazar-Ortiz, J, Camous, S, Briant, C, Lardic, L, Chesneau, D et Guillaume, D. 2011. Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (*Equus caballus*). *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E 9: 130.
- Sale, E M et Sale, G J. 2008. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 65: 113-127.
- Salmon, W D, Jr. et Daughaday, W H. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 49: 825-836.
- Saltiel, A R et Kahn, C R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.
- Samuel, C A, Allen, W R et Steven, D H. 1974. Studies on the equine placenta. I. Development of the microcotyledons. *Journal of reproduction and fertility* 41: 441-445.
- Samuel, C A, Allen, W R et Steven, D H. 1975. Ultrastructural development of the equine placenta. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 575-578.
- Samuel, C A, Allen, W R et Steven, D H. 1977. Studies on the equine placenta. III. Ultrastructure of the uterine glands and the overlying trophoblast. *Journal of reproduction and fertility* 51: 433-437.
- Sandgren, B, Dalin, G et Carlsten, J. 1993. Osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragment in the fetlock joints in Standardbred trotters. I. *Epidemiology. Equine veterinary journal supplement* 16: 31-37.
- Sano, H, Kane, S, Sano, E, Miinea, C P, Asara, J M, Lane, W S et al. 2003. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *The Journal of biological chemistry* 278: 14599-14602.
- Sato, A, Otsu, E, Negishi, H, Utsunomiya, T et Arima, T. 2007. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Human reproduction* 22: 26-35.

- Savage, C J, McCarthy, R N et Jeffcott, L B. 1993. Effects of dietary energy and protein on induction of dyschondroplasia in foals. *Equine veterinary journal supplement* 16: 74-79.
- Schipani, E, Ryan, H E, Didrickson, S, Kobayashi, T, Knight, M et Johnson, R S. 2001. Hypoxia in cartilage: HIF-1 $\alpha$  is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & development* 15: 2865-2876.
- Schlechter, N L, Russell, S M, Spencer, E M et Nicoll, C S. 1986. Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 7932-7934.
- Schlüssel, M M, de Castro, J A, Kac, G, da Silva, A A, Cardoso, V C, Bettiol, H et al. 2010. Birth weight and bone mass in young adults from Brazil. *Bone* 46: 957-963.
- Schryver, H F, Oftedal, O T, Williams, J, Cymbaluk, N F, Antczak, D et Hintz, H F. 1986a. A comparison of the mineral composition of milk of domestic and captive wild equids (*Equus przewalski*, *E. zebra*, *E. burchelli*, *E. caballus*, *E. assinus*). *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology* 85: 233-235.
- Schryver, H F, Oftedal, O T, Williams, J, Soderholm, L V et Hintz, H F. 1986b. Lactation in the horse: the mineral composition of mare milk. *The Journal of nutrition* 116: 2142-2147.
- Scott, K A, Yamazaki, Y, Yamamoto, M, Lin, Y, Melhorn, S J, Krause, E G et al. 2010. Glucose parameters are altered in mouse offspring produced by assisted reproductive technologies and somatic cell nuclear transfer. *Biology of reproduction* 83: 220-227.
- Seufert, J, Kieffer, T J, Leech, C A, Holz, G G, Moritz, W, Ricordi, C et al. 1999. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84: 670-676.
- Sharma, O P. 1974. Release of oxytocin elicited by suckling stimulus in mares. *Journal of reproduction and fertility* 37: 421-423.
- Shepherd, P R, Crowther, N J, Desai, M, Hales, C N et Ozanne, S E. 1997. Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *The British journal of nutrition* 78: 121-129.
- Silver, M et Comline, R S. 1975. Transfer of gases and metabolites in the equine placenta: a comparison with other species. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 589-594.
- Silver, M, Barnes, R J, Comline, R S, Fowden, A L, Clover, L et Mitchell, M D. 1979. Prostaglandins in maternal and fetal plasma and in allantoic fluid during the second half of gestation in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 531-539.
- Silver, M, Steven, D H et Comline, R S (Editors). 1973. Placental exchange and morphology in ruminants and mares. *Placental Gas exchange*. DHEW, Washington, DC, 113 pp.

- Silver, M. 1990. Prenatal maturation, the timing of birth and how it may be regulated in domestic animals. *Experimental physiology* 75: 285-307.
- Silver, M. 1994. Placental progestagens in the sheep and horse and the changes leading to parturition. *Experimental and clinical endocrinology* 102: 203-211.
- Silvestrini, G, Ballanti, P, Patacchioli, F R, Mocetti, P, Di Grezia, R, Wedard, B M et al. 2000. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone* 26: 33-42.
- Silvestrini, G, Mocetti, P, Ballanti, P, Di Grezia, R et Bonucci, E. 1999. Cytochemical demonstration of the glucocorticoid receptor in skeletal cells of the rat. *Endocrine research* 25: 117-128.
- Slot, J W, Geuze, H J, Gigengack, S, Lienhard, G E et James, D E. 1991. Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *The Journal of cell biology* 113: 123-135.
- Smeets, T et van Buul-Offers, S. 1986. Influence of growth hormone and thyroxine on cell kinetics in the proximal tibial growth plate of Snell dwarf mice. *Cell and tissue kinetics* 19: 161-170.
- Smink, J J, Gresnigt, M G, Hamers, N, Koedam, J A, Berger, R et Van Buul-Offers, S C. 2003. Short-term glucocorticoid treatment of prepubertal mice decreases growth and IGF-I expression in the growth plate. *The Journal of endocrinology* 177: 381-388.
- Smink, J J, Koster, J G, Gresnigt, M G, Rooman, R, Koedam, J A et Van Buul-Offers, S C. 2002. IGF and IGF-binding protein expression in the growth plate of normal, dexamethasone-treated and human IGF-II transgenic mice. *The Journal of endocrinology* 175: 143-153.
- Smith, T R, Elmendorf, J S, David, T S et Turinsky, J. 1997. Growth hormone-induced insulin resistance: role of the insulin receptor, IRS-1, GLUT-1, and GLUT-4. *The American journal of physiology* 272: E1071-1079.
- Smith, U. 2002. Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 26: 897-904.
- Smolders, E A A, van der Veen, N G et Vvan Polanen, A. 1990. Composition of horse milk during the suckling period. *Livestock production science* 25: 163-171.
- Soto, N, Bazaes, R A, Pena, V, Salazar, T, Avila, A, Iniguez, G et al. 2003. Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88: 3645-3650.
- Squires, E L et Ginther, O J. 1975. Follicular and luteal development in pregnant mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 429-433.

- Ssewanyana, E, Lincoln, G A, Linton, E A et Lowry, P J. 1990. Regulation of the seasonal cycle of beta-endorphin and ACTH secretion into the peripheral blood of rams. *The Journal of endocrinology* 124: 443-454.
- Starbuck, G R, Stout, T A, Lamming, G E, Allen, W R et Flint, A P. 1998. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. *Journal of reproduction and fertility* 113: 173-179.
- Steven, D H et Samuel, C A. 1975. Anatomy of the placental barrier in the mare. *Journal of reproduction and fertility supplement* 23: 579-582.
- Stewart, F, Allen, W R et Moor, R M. 1976. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *The Journal of endocrinology* 71: 471-482.
- Stock, K F, Hamann, H et Distl, O. 2005. Prevalence of osseous fragments in distal and proximal interphalangeal, metacarpo- and metatarsophalangeal and tarsocrural joints of Hanoverian Warmblood horses. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* 52: 388-394.
- Stout, T A et Allen, W R. 2001. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. *Reproduction* 121: 771-775.
- Stout, T A et Allen, W R. 2002. Prostaglandin E(2) and F(2 alpha) production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction* 123: 261-268.
- Stout, T A, Meadows, S et Allen, W R. 2005. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. *Animal reproduction science* 87: 269-281.
- Strobel, A, Issad, T, Camoin, L, Ozata, M et Strosberg, A D. 1998. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature genetics* 18: 213-215.
- Sutton, E I, Bowland, J P et Ratcliff, W D. 1977. Influence of level of energy and nutrient intake by mares on reproductive performances and blood serum composition of the mares and foals. *Canadian journal of animal science* 57: 551-558.
- Tait, A D, Santikarn, S et Allen, W R. 1983. Identification of 3 beta-hydroxy-5,7-pregnadien-20-one and 3 beta-hydroxy-5,7-androstadien-17-one as endogenous steroids in the fetal horse gonad. *The Journal of endocrinology* 99: 87-92.
- Takeda, S, Eleftheriou, F, Levasseur, R, Liu, X, Zhao, L, Parker, K L et al. 2002. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111: 305-317.
- Taniguchi, C M, Emanuelli, B et Kahn, C R. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7: 85-96.
- Terqui, M et Palmer, E. 1979. Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 441-446.
- Thompson, J G, Kind, K L, Roberts, C T, Robertson, S A et Robinson, J S. 2002. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? *Human reproduction* 17: 2783-2786.

- Thorburn, G D. 1993. A speculative review of parturition in the mare. *Equine veterinary journal supplement 14*: 41-49.
- Thorens, B et Mueckler, M. 2010. Glucose transporters in the 21st Century. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism 298*: E141-145.
- Tischner, M. 1985. Embryo recovery from Polish-pony mares and preliminary observations on foal size after transfer of embryos to large mares. *Equine veterinary journal 3*: 96-98.
- Tischner, M. 1987. Development of Polish-pony foals born after embryo transfer to large mares. *J Reprod Fert 35*: 705-709.
- Treiber, K H, Hess, T M, Kronfeld, D S, Bosoton, R C, Geor, R J et Harris, P. 2005a. Insulin resistance and compensation in laminitis-predisposed ponies characterized by the minimal model. *Pferdeheilkunde 21*: 91-92.
- Treiber, K H, Kronfeld, D S et Geor, R J. 2006a. Insulin resistance in equids: possible role in laminitis. *The Journal of nutrition 136*: 2094S-2098S.
- Treiber, K H, Kronfeld, D S, Hess, T M, Boston, R C et Harris, P A. 2005b. Use of proxies and reference quintiles obtained from minimal model analysis for determination of insulin sensitivity and pancreatic beta-cell responsiveness in horses. *American journal of veterinary research 66*: 2114-2121.
- Treiber, K H, Kronfeld, D S, Hess, T M, Byrd, B M et Splan, R K. 2005c. Pre-laminitic metabolic syndrome in genetically predisposed ponies involves compensated insulin resistance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 89*.
- Treiber, K H, Kronfeld, D S, Hess, T M, Byrd, B M, Splan, R K et Staniar, W B. 2006b. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in ponies. *Journal of the American Veterinary Medical Association 228*: 1538-1545.
- Trillaud-Geyl, C et Martin-Rosset, W. 1990. Exploitation du pâturage par le cheval en croissance. In: 16ème Journée de la Recherche Equine, Paris. p 30-45.
- Trillaud-Geyl, C et Martin-Rosset, W. 2005. Feeding the young horse managed with moderate growth. In: 2nd European Workshop on Equine Nutrition. p 147-158.
- Trumble, T N, Brown, M P et Merritt, K A. 2009. Decreased aggrecan (G1/G2) to CTX II ratios in synovial fluid of horses with osteochondral injury. In: 55th Annual meeting of the orthopaedic research society, Las Vegas, USA
- Tsukada, A, Ohkubo, T, Sakaguchi, K, Tanaka, M, Nakashima, K, Hayashida, Y et al. 1998. Thyroid hormones are involved in insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by stimulating hepatic growth hormone receptor (GHR) gene expression in the chicken. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society 8*: 235-242.
- Ullrey, D E, Struthers, R D, Hendricks, D G et Brent, B E. 1966. Composition of mare's milk. *Journal of animal science 25*: 217-222.
- USDA. 1998. Management of health and horses, Fort Collins, CO.
- USDA. 2000. Lameness and laminitis in US horses, Fort Collins, CO.

- Valentino, L W, Lillich, J D, Gaughan, E M, Biller, D R et Raub, R H. 1999. Radiographic prevalence of osteochondrosis in yearling feral horses. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology* 12: 151-155.
- Valette, J P, Robert, C, Toquet, M P, Denoix, J M et Fortier, G. 2007. Evolution of some biochemical markers of growth in relation to osteoarticular status in young horses: results of a longitudinal study in three breeds. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 4: 23-29.
- Valette, J P, Robert, C, Toquet, M P, Denoix, J M et Fortier, G. 2007. Evolution of some biochemical markers of growth in relation to osteoarticular status in young horses: results of a longitudinal study in three breeds. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 4: 23-29.
- van den Boom, R, Brama, P A, Kiers, G H, de Groot, J et van Weeren, P R. 2004. Assessment of the effects of age and joint disease on hydroxyproline and glycosaminoglycan concentrations in synovial fluid from the metacarpophalangeal joint of horses. *American journal of veterinary research* 65: 296-302.
- van der Eerden, B C, Gevers, E F, Lowik, C W, Karperien, M et Wit, J M. 2002. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the epiphyseal plate of the rat. *Bone* 30: 478-485.
- van der Eerden, B C, Karperien, M et Wit, J M. 2003. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocrine reviews* 24: 782-801.
- van der Heyden, L, Lejeune, J P, Caudron, I, Detilleux, J, Sandersen, C, Chavatte, P et al. 2013b. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *Veterinary record* 172: 68.
- van der Heyden, L, Serteyn, D, Caudron, I, Verwilhen, D et Lejeune, J P. 2008. Prévalence de l'ostéochondrose chez le cheval de sport de Wallonie. *Annales de médecine vétérinaire* 152: 131-137.
- van Niekerk, C H et Allen, W R. 1975. Early embryonic development in the horse. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 495-498.
- van Weeren, P R, Knaap, J et Firth, E C. 2003. Influence of liver copper status of mare and newborn foal on the development of osteochondrotic lesions. *Equine veterinary journal* 35: 67-71.
- van Weeren, P R, Sloet van, O-O et Barneveld, A. 1999. The influence of birth weight, rate of weight gain and final achieved height and sex on the development of osteochondrotic lesions in a population of genetically predisposed Warmblood foals. *Equine veterinary journal. Supplement* : 26-30.
- van Weeren, P R. 2005. Equine osteochondrosis: a challenging enigma. *Pferdeheilkunde* 21: 285-292.
- van Weyenberg, S. 2008. Leptin, obesity and equine insulin resistance, University of Ghent.
- Veenendaal, M V, Painter, R C, de Rooij, S R, Bossuyt, P M, van der Post, J A, Gluckman, P D et al. 2013. Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 120: 548-553.

- Veening, M A, van Weissenbruch, M M, Heine, R J et Delemarre-van de Waal, H A. 2003. Beta-cell capacity and insulin sensitivity in prepubertal children born small for gestational age: influence of body size during childhood. *Diabetes* 52: 1756-1760.
- Veldhuis, J D. 1998. Neuroendocrine control of pulsatile growth hormone release in the human: relationship with gender. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 8 Suppl B: 49-59.
- Verhaeghe, J, van Bree, R, van Herck, E, Rummens, K, Vercruyse, L, Bouillon, R et al. 1999. Pathogenesis of fetal hypomineralization in diabetic rats: evidence for delayed bone maturation. *Pediatric research* 45: 209-217.
- Verwilghen, D R, Janssens, S, Busoni, V, Pille, F, Johnston, C et SerTEYN, D. 2013. Do developmental orthopaedic disorders influence future jumping performances in Warmblood stallions? *Equine veterinary journal* 45: 578-581.
- Vick, M M, Adams, A A, Murphy, B A, Sessions, D R, Horohov, D W, Cook, R F et al. 2007. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of animal science* 85: 1144-1155.
- Vick, M M, Sessions, D R, Murphy, B A, Kennedy, E L, Reedy, S E et Fitzgerald, B P. 2006. Obesity is associated with altered metabolic and reproductive activity in the mare: effects of metformin on insulin sensitivity and reproductive cyclicity. *Reproduction, fertility, and development* 18: 609-617.
- Vickers, M H. 2014. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients* 6: 2165-2178.
- Vivrette, S L, Kindahl, H, Munro, C J, Roser, J F et Stabenfeldt, G H. 2000. Oxytocin release and its relationship to dihydro-15-keto PGF<sub>2</sub>alpha and arginine vasopressin release during parturition and to suckling in postpartum mares. *Journal of reproduction and fertility* 119: 347-357.
- von Neseni, R, Flade, E, Heidler, G et Steger, H. 1958. Milchleistung und Milchzusammensetzung von Stuten im Verlaufe des Laktation. *Archiv Tierzucht* 1: 91-129.
- von Neseni, R, Flade, E, Heidler, G et Steger, H. 1958. Milchleistung und Milchzusammensetzung von Stuten im Verlaufe des Laktation. *Archiv Tierzucht* 1: 91-129.
- Vos, N J. 2008. Incidence of osteochondrosis (dissecans) in Dutch warmblood horses presented for pre-purchase examination. *Irish veterinary journal* 61: 33-37.
- Voute, L C, Henson, F M, Platt, D et Jeffcott, L B. 2011. Osteochondrosis lesions of the lateral trochlear ridge of the distal femur in four ponies. *The Veterinary record* 168: 265.
- Vu, T H, Shipley, J M, Bergers, G, Berger, J E, Helms, J A, Hanahan, D et al. 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93: 411-422.
- Wakita, R, Izumi, T et Itoman, M. 1998. Thyroid hormone-induced chondrocyte terminal differentiation in rat femur organ culture. *Cell and tissue research* 293: 357-364.



- Wallace, J M, Milne, J S, Aitken, R P et Adam, C L. 2014. Impact of embryo donor adiposity, birthweight and gender on early postnatal growth, glucose metabolism and body composition in the young lamb. *Reproduction, fertility, and development* 26: 665-681.
- Wallin, L, Strandberg, E, Philipsson, J et Dalin, G. 2000. Estimates of longevity and causes of culling and death in Swedish warmblood and coldblood horses. *Livestock production science* 63: 275-289.
- Walton, A et Hammond, J. 1938. The maternal effects on growth and conformation in Shire horse-Shetland pony crosses. *Proc R Soc B* 125: 311-335.
- Walton, A et Hammond, J. 1938. The maternal effects on growth and conformation in Shire horse-Shetland pony crosses. *Proc R Soc B* 125: 311-335.
- Wang, J, Zhou, J et Bondy, C A. 1999. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13: 1985-1990.
- Wang, L, Shao, Y Y et Ballock, R T. 2011. Leptin synergizes with thyroid hormone signaling in promoting growth plate chondrocyte proliferation and terminal differentiation in vitro. *Bone* 48: 1022-1027.
- Wang, N, Le, F, Zhan, Q T, Li, L, Dong, M Y, Ding, G L et al. 2010. Effects of In Vitro Maturation on Histone Acetylation in Metaphase II Oocytes and Early Cleavage Embryos. *Obstetrics and gynecology international* 2010: 989278.
- Wang, W et Kirsch, T. 2002. Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *The Journal of cell biology* 157: 1061-1069.
- Wang, W, Xu, J et Kirsch, T. 2003. Annexin-mediated Ca<sup>2+</sup> influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 278: 3762-3769.
- Wattez, J S, Delahaye, F, Barella, L F, Dickes-Coopman, A, Montel, V, Breton, C et al. 2014. Short- and long-term effects of maternal perinatal undernutrition are lowered by cross-fostering during lactation in the male rat. *Journal of developmental origins of health and disease* 5: 109-120.
- Weaver, I C, Cervoni, N, Champagne, F A, D'Alessio, A C, Sharma, S, Seckl, J R et al. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience* 7: 847-854.
- Weber, J A, Freeman, D A, Vanderwall, D K et Woods, G L. 1991. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biology of reproduction* 45: 544-546.
- Wei, J et Ducy, P. 2010. Co-dependence of bone and energy metabolisms. *Archives of biochemistry and biophysics* 503: 35-40.
- Wei, J, Hanna, T, Suda, N, Karsenty, G et Ducy, P. 2014. Osteocalcin promotes beta-cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a. *Diabetes* 63: 1021-1031.
- Weise, M, De-Levi, S, Barnes, K M, Gafni, R I, Abad, V et Baron, J. 2001. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 6871-6876.

- Werther, G A, Haynes, K, Edmonson, S, Oakes, S, Buchanan, C J, Herington, A C et al. 1993. Identification of growth hormone receptors on human growth plate chondrocytes. *Acta paediatrica* 82 Suppl 391: 50-53.
- Weyer, C, Funahashi, T, Tanaka, S, Hotta, K, Matsuzawa, Y, Pratley, R E et al. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86: 1930-1935.
- White, M F et Yenush, L. 1998. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Current topics in microbiology and immunology* 228: 179-208.
- Wigglesworth, J S. 1964. Experimental Growth Retardation in the Foetal Rat. *The Journal of pathology and bacteriology* 88: 1-13.
- Williams, C L, Teeling, J L, Perry, V H et Fleming, T P. 2011. Mouse maternal systemic inflammation at the zygote stage causes blunted cytokine responsiveness in lipopolysaccharide-challenged adult offspring. *BMC Biology* 9: 49.
- Wilsher, S et Allen, W R. 2006. Effects of a *Streptococcus equi* infection-mediated nutritional insult during mid-gestation in primiparous Thoroughbred fillies. Part 1: placental and fetal development. *Equine veterinary journal* 38: 549-557.
- Wooding, F B, Morgan, G, Fowden, A L et Allen, W R. 2001. A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. *Placenta* 22: 749-767.
- Woods, K A, Camacho-Hubner, C, Savage, M O et Clark, A J. 1996. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *The New England journal of medicine* 335: 1363-1367.
- Worthy, K, Escreet, R, Renton, J P, Eckersall, P D, Douglas, T A et Flint, D J. 1986. Plasma prolactin concentrations and cyclic activity in pony mares during parturition and early lactation. *Journal of reproduction and fertility* 77: 569-574.
- Wright, D E et Wolff, J E. 1976. Measuring milk intake of lambs suckling grazing ewes by a double isotope method. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 36: 99-102.
- Wu, G, Bazer, F W, Wallace, J M et Spencer, T E. 2006. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *Journal of animal science* 84: 2316-2337.
- Wylie, C E, Collins, S N, Verheyen, K L et Newton, J R. 2013. A cohort study of equine laminitis in Great Britain 2009-2011: estimation of disease frequency and description of clinical signs in 577 cases. *Equine veterinary journal* 45: 681-687.
- Wylie, C E, Collins, S N, Verheyen, K L et Richard Newton, J. 2011. Frequency of equine laminitis: a systematic review with quality appraisal of published evidence. *Vet J* 189: 248-256.
- Wyse, C A, McNie, K A, Tannahill, V J, Murray, J K et Love, S. 2008. Prevalence of obesity in riding horses in Scotland. *The Veterinary record* 162: 590-591.

- Yadav, V K, Oury, F, Suda, N, Liu, Z W, Gao, X B, Confavreux, C et al. 2009. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 138: 976-989.
- Yamamoto, T. 1981. Diagnostic value of free hydroxyproline in horse serum. *Bulletin Of Equine Research Institute* : 3-83.
- Yoakam, S C, Kirkham, W W et Beeson, W M. 1978. Effect of protein level on growth in young ponies. *Journal of animal science* 46: 983-991.
- Young, L E, Fernandes, K, McEvoy, T G, Butterwith, S C, Gutierrez, C G, Carolan, C et al. 2001. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature genetics* 27: 153-154.
- Ytrehus, B, Carlson, C S et Ekman, S. 2007. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. *Veterinary pathology* 44: 429-448.
- Yuan, X, Wang, J, Zhu, X, Zhang, Z, Ai, Y, Sun, G et al. 2011. Effect of copper on levels of collagen and alkaline phosphatase activity from chondrocytes in newborn piglets in vitro. *Biological trace element research* 144: 597-605.
- Zavy, J T, Mayer, R, Vernon, M W, Bazer, F W et Sharp, D C. 1979. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* : 403-411.
- Zeng, G et Quon, M J. 1996. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 98: 894-898.
- Zerpa, H, Vega, F, Vasquez, J, Ascanio, E, Campos, G, Sogbe, E et al. 2005. Effect of acute sublethal endotoxaemia on in vitro digital vascular reactivity in horses. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* 52: 67-73.
- Zierath, J R, Houseknecht, K L, Gnudi, L et Kahn, B B. 1997. High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. *Diabetes* 46: 215-223.
- Zung, A, Phillip, M, Chalew, S A, Palese, T, Kowarski, A A et Zadik, Z. 1999. Testosterone effect on growth and growth mediators of the GH-IGF-I axis in the liver and epiphyseal growth plate of juvenile rats. *Journal of molecular endocrinology* 23: 209-221.



## **Origines développementales des anomalies de l'homéostasie glucidique, de la croissance osseuse et prédisposition à l'ostéochondrose chez le poulain**

Les adaptations du fœtus aux *stimuli* intra-utérins ont des conséquences immédiates puis à long terme sur sa santé après la naissance. Chez l'équin, ce concept connu sous le nom de DOHaD (*Developmental Origins of Health and Disease*) a été validé à l'aide de croisements inter-races : la taille de la jument, qui conditionne l'environnement maternel pendant la gestation puis la lactation, a un impact crucial sur la croissance postnatale du poulain, mais aussi sur la sensibilité à l'insuline du nouveau-né. L'ostéochondrose, pathologie du cheval en croissance, est responsable de pertes financières majeures pour la filière équine. Elle a été reliée à des anomalies de l'homéostasie glucidique et son origine anténatale est fortement suspectée. Dans cette thèse, nous avons mesuré l'impact de perturbations expérimentales au cours du développement fœtal sur la croissance, l'homéostasie glucidique et la prédisposition à l'ostéochondrose du poulain jusqu'à l'âge de 1 an ½. Un premier modèle de croissance fœtale augmentée *versus* restreinte a été obtenu par transferts d'embryons inter-races (« poneys dans traits » *versus* « selles dans poneys », respectivement). L'environnement maternel « enrichi » de la jument de trait *versus* restreint de la ponette s'est révélé déterminant dans la régulation de la croissance des différents segments osseux, de l'axe thyroïdienne, de la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques, de la sensibilité à l'insuline de l'organisme et de la santé ostéoarticulaire du poulain dès la naissance et jusqu'à 1 an ½. Tout en validant le concept de DOHaD chez l'équin, ce modèle souligne le soin qui doit être apporté à la sélection des juments receveuses dans la pratique du transfert d'embryons. En démontrant l'ampleur des effets post-nataux programmés *in utero* et pendant la lactation, ce modèle alerte aussi l'éleveur sur la gestion des poulinières et ses impacts à long terme. En ce sens, le second modèle est en adéquation avec les préoccupations d'élevage puisqu'une perturbation de l'environnement nutritionnel du fœtus a été induite en apportant un concentré (orge) dans la ration hivernale de la jument gravide *versus* des fourrages uniquement. A ce jour, l'impact de cette modification anténatale sur l'homéostasie glucidique du poulain avant sevrage semble limité à la période néonatale, tandis que sa croissance n'est pas du tout affectée. En revanche, sa prédisposition à l'ostéochondrose à l'âge de 6 mois semble être accrue, ce qui ne permet pas de présager de la suite car le statut ostéoarticulaire du poulain âgé de 6 mois reste susceptible d'évoluer jusqu'à 1 an ½. Ces travaux devraient permettre d'ajuster les recommandations nutritionnelles chez les poulinières.

**Mots clefs :** cheval, DOHaD, placenta, croissance, homéostasie glucidique, ostéochondrose, transfert d'embryon, nutrition

## **Developmental origins of abnormalities of glucose homeostasis, of bone growth and predisposition to osteochondrosis in foals**

Fetal adaptations to intra-uterine *stimuli* have immediate and long term effects on the offspring's health after birth. In equids, this concept known as the DOHaD (*Developmental Origins of Health and Disease*) was validated using cross-breeding: the mare's size which affects the fetal environment throughout gestation and then lactation, has a critical impact on the foal's post-natal growth, as well as on the neonate's sensitivity to insulin. Osteochondrosis, a pathology of the growing horse, induces heavy financial losses in the equine industry. It has been associated to abnormalities in glucose homeostasis and its antenatal origin is highly suspected. The present research aimed to evaluate the impact of experimental disturbances during fetal development on growth, glucose homeostasis and predisposition to osteochondrosis in the foal until age 1½ year. Increased *versus* restricted fetal growth was obtained using between-breed embryo transfers ("ponies in draft horses" *versus* "saddlebreds in ponies", respectively). The lush environment of the draft mare *versus* the restricted environment of the pony mare turned out to be critical in the regulation of bone growth, thyroid hormones secretion,  $\beta$ -cells function, insulin sensitivity and the osteoarticular status of the foal from birth to 1½ year of age. This validates the concept of the DOHaD in equids and shows that recipient mares should be carefully selected in embryo transfer practice. By demonstrating the scope of post-natal effects which were programmed *in utero* and throughout the lactating period, it also alerts the breeder about the importance of broodmare management and its long term impacts. Thus, the second model was developed to address breeders' practices. A disturbance of the nutritional environment of the fetus was induced by supplementing mares in late pregnancy with concentrated feed (barley). So far, only the neonatal foal's glucose homeostasis was affected, whereas all other studied parameters, including growth, were not affected. The foal's predisposition to osteochondrosis, however, was increased at 6 months of age, which does not preclude that it will affect the animals afterwards since the osteoarticular status of the 6-month-old foal will evolve beyond weaning time. This research could help adjust nutritional recommendations to broodmares.

**Keywords:** horse, DOHaD, placenta, growth, glucose homeostasis, osteochondrosis, embryo transfer, nutrition