



HAL
open science

Prolactine placentaire et anomalies de croissance au cours du diabète maternel

Pierrette Perimenis

► **To cite this version:**

Pierrette Perimenis. Prolactine placentaire et anomalies de croissance au cours du diabète maternel. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S047 . tel-01167833

HAL Id: tel-01167833

<https://theses.hal.science/tel-01167833v1>

Submitted on 24 Jun 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 Droit et Santé de Lille 2
École doctorale Biologie-Santé

THÈSE D'UNIVERSITÉ

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LILLE 2

Discipline : Physiologie et Biologie des organismes

Spécialité: Endocrinologie, Diabète et Maladies métaboliques

PROLACTINE PLACENTAIRE ET ANOMALIES DE CROISSANCE AU COURS DU DIABÈTE MATERNEL

Présentée et soutenue publiquement par

Pierrette PERIMENIS

Le 30 Septembre 2014

Composition du Jury

M. le Professeur Amar ABDERRAHMANI

Président du jury

Mme le Professeur Danièle EVAIN-BRION

Rapporteur

M. le Professeur Vincent SAPIN

Rapporteur

Mme le Professeur Jamileh MOVASSAT

Examineur

Mme le Docteur Isabelle FAJARDY

Examineur

Mme le Professeur Anne VAMBERGUE

Directeur de thèse

RÉSUMÉS

RÉSUMÉ: PROLACTINE PLACENTAIRE ET ANOMALIES DE CROISSANCE AU COURS DU DIABÈTE MATERNEL

Malgré l'amélioration des prises en charge diabétologiques et obstétricales, la grossesse chez la patiente ayant un diabète pré-gestationnel ou gestationnel reste à ce jour à haut risque pour la mère et pour l'enfant. Chez l'enfant, les anomalies de croissance, macrosomie, mais parfois Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) restent à ce jour très fréquentes avec des conséquences à court et à long terme. La croissance fœtale est un processus complexe mettant en jeu la susceptibilité génétique fœtale mais surtout le milieu intra-utérin à savoir l'environnement métabolique maternel et placentaire. Les mécanismes physiopathologiques en lien avec ces anomalies de croissance dans ce contexte de diabète restent encore incompris et mal expliqués par l'hyperglycémie maternelle seule. A l'interface entre la mère et le fœtus, le placenta exerce plusieurs fonctions influençant le métabolisme maternel et fœto-placentaire donc le développement de l'unité fœto-placentaire. Le placenta, acteur crucial de la programmation fœtale, va s'adapter à son environnement afin de permettre la survie fœtale.

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le compartiment placentaire en analysant l'expression des gènes impliqués dans la croissance fœto-placentaire afin de déterminer des facteurs prédictifs des anomalies de croissance au cours du diabète maternel. Pour répondre à cet objectif, nous avons d'abord utilisé un modèle de rate gestante rendue diabétique par la streptozotocine seule ou associée avec le nicotinamide et validé certains de nos résultats dans des placentas issus de patientes diabétiques de type 1.

L'analyse du transcriptome placentaire a mis en évidence l'implication prépondérante de certains gènes appartenant à la famille prolactine (PRL), au système rénine-angiotensine et aux métalloprotéases. La caractéristique phénotypique de ces rats était de présenter un RCIU à la naissance avec sur le plan histologique une hypovascularisation placentaire associée.

Nous nous sommes surtout intéressés aux gènes placentaires appartenant à la famille PRL, non décrits auparavant dans la littérature dans le diabète, comme *prl8a2*, connu aussi sous le nom de *Dprp* (Decidual Prolactin Related-Protein). La PRL dans sa forme native de 23-kDa a des propriétés pro-angiogéniques alors que clivée en vasoinhibines par la Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1), la cathepsine D, a des propriétés anti-angiogéniques. Chez nos 2 modèles

de rates, nous confirmons une surexpression par qPCR de *Dprp*, et de *Bmp-1* et une augmentation du rapport du clivage de la PRL et donc des vasoinhibines par rapport aux contrôles.

Nous avons pu valider ces résultats dans des placentas de patientes diabétiques de type 1 dont la caractéristique chez les nouveaux nés était d'avoir un petit poids de naissance.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la cinétique de ces anomalies concernant la famille PRL dans nos modèles animaux. Nous avons pu montrer chez la rate gestante diabétique que le RCIU était présent dès le 14^{ème} jour de gestation et que la quantité en vasoinhibines et l'expression des gènes *Bmp-1* et *Dprp* n'étaient modifiées qu'à partir du 17^{ème} jour de gestation.

Ces travaux sont en faveur d'une implication de la PRL placentaire et de ses vasoinhibines dans le diabète maternel laissant leur supposer un rôle dans l'hypovascularisation placentaire, mise en évidence à la fois chez l'homme et l'animal.

En perspective, nous envisageons de poursuivre ces travaux avec une approche plus fonctionnelle. Il convient d'analyser plus finement la relation entre vasoinhibines et hyperglycémie en tenant compte du degré et de la durée d'exposition de l'hyperglycémie. Enfin, il serait intéressant de regarder l'implication de la PRL placentaire non plus au cours du RCIU mais plutôt au cours de la macrosomie fœtale, qui reste l'anomalie de croissance la plus fréquente au cours du diabète maternel.

ABSTRACT: PLACENTAL PRL AND GROWTH DISORDERS DURING MATERNAL DIABETES

Despite improvements in obstetrics and increased awareness of diabetes during pregnancy, pregnant women who presenting with gestational or pregestational diabetes remain at high risk, as does the unborn child. For the child, fetal growth disorders, such as macrosomia and intra-uterine growth restriction (IUGR), are still frequent and have short- and long-term consequences. Fetal growth is a complex process involving genetic susceptibility of the fetus, but also the intra-uterine environment, especially regarding aspects of maternal and placental metabolism. The links between the physiopathological mechanisms of these disorders and fetal growth in the context of maternal diabetes remain unclear and can be only partially explained by maternal hyperglycemia.

The placental interface between the mother and fetus has multiple functions, which influence maternal, fetal, and placental metabolism and, consequently, fetoplacental development. The placenta has a crucial role in fetal programming, and must adapt its environment towards protecting the fetus.

The objectives of this study were to assess the placental compartment. We analyzed the expression of genes involved in fetoplacental growth to determine which predictive factors determine these growth disorders during maternal diabetes. To achieve these objectives, we initially investigated a model of gestational rat diabetes induced by streptozotocin alone or combined with nicotinamide. We then validated some of our results in the placentas from type-1 diabetic mothers.

In the rat model, analysis of placental microarray indicated involvement of genes within the prolactin (PRL) family, within the renin–angiotensin–aldosterone system, and within the metalloproteinase family. The principal phenotypical characteristic of pups at birth was IUGR with histologically associated placental hypo-vascularization.

We then specifically focused on placental genes within the *PRL* family, which have not been previously studied with regards to diabetes: i.e., *prl8a2*, also known as *Dprp* (decidual prolactin related-protein). *Dprp* was upregulated by qPCR analysis in our diabetic rat models.

PRL in its native 23-kDa form is proangiogenic, but when processed by the bone morphogenetic protein 1 (BMP-1) or cathepsin D (CTSD) to form vasoinhibins, it then has antiangiogenic properties. In our rat model, we have shown that qPCR upregulation of *Bmp-1* resulted in an increase amount of vasoinhibins when compared to controls.

We then validated some of these results in the placentas from diabetic type 1 women who had given birth to newborns with a characteristic small birth weight.

We were also interested in the course of these PRL disorders within our animal model during pregnancy. We demonstrated that IUGR was present by the 14th day of gestation. However, *Bmp-1* or *Dprp* gene expression and the amount of vasoinhibin did not differ between the groups by the 14th day of gestation, but had become modified by 17th day of gestation.

These studies highlight the placental involvement of PRL and vasoinhibins during maternal diabetes. Our results suggest a role for PRL in placental hypo-vascularization in rats and women.

Our future goal is to conduct, more specifically, detailed analyses on the links between hyperglycemia and vasoinhibins regarding their degrees and timeframes of activity. It would also be of interest to study the involvement of placental PRL, not only in cases of IUGR but also in macrosomia, which remains the most frequent fetal-growth disorder during maternal diabetes.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

ARTICLES ORIGINAUX

Placental antiangiogenic prolactin fragments are increased in human and rat maternal diabetes.

Perimenis P; Bouckenooghe T; Delplanque J; Moitrot E; Eury E; Lobbens S; Gosset P; Devisme L; Duvillie B; Abderrahmani A; Storme ;, Fontaine P; Froguel P; Vambergue A.
Biochim Biophys Acta. 2014, 1842 (9); 1783-1793, accepted on Jun 28, doi:
10.1016/j.bbadis.2014.06.026

COMMUNICATIONS ORALES

Augmentation de la prolactine déciduale et de ses fragments dans le placenta de patientes diabétiques de type 1.

Perimenis Pierrette; Moitrot Emmanuelle; Fajardy Isabelle; Fontaine Pierre; Storme Laurent; Deruelle Philippe; Vambergue Anne; JFRN (Journées Françaises en Recherche Néonatale), décembre 2013

Placental prolactin family members are involved during maternal diabetes in both rats and type 1 diabetes women.

Perimenis Pierrette; Moitrot Emmanuelle; Eury Elodie; Lobbens Stéphane; Bouckenooghe Thomas; Gosset Pierre; Storme Laurent; Fontaine Pierre; Froguel Philippe; Vambergue Anne; 13^{ème} Journées doctorales de Lille 2, André Verbert, septembre 2013.

Augmentation de l'expression de la prolactine placentaire dans un modèle de rate gestante diabétique.

Perimenis Pierrette; Bouckenooghe Thomas; Eury Elodie; Lobbens Stéphane; Gosset Pierre; Fontaine Pierre; Froguel Philippe; Storme Laurent; Vambergue Anne, SFE (Société Française d'Endocrinologie), octobre 2012

Transcriptomic analysis demonstrated a placental dysfunction during maternal diabetes?

Bouckenooghe Thomas ; Perimenis Pierrette; Eury Elodie; Lobbens Stéphane; Gosset Pierre; Fontaine Pierre; Froguel Philippe; Storme Laurent; Vambergue Anne, EASD (European Association for the Study of Diabetes), octobre 2012

Transcriptomic analysis demonstrated a placental dysfunction during maternal diabetes?

Perimenis Pierrette; Bouckenooghe Thomas; Eury Elodie; Lobbens Stéphane; Sisino Giorgia ; Gosset Pierre; Fontaine Pierre; Froguel Philippe; Storme Laurent; Vambergue Anne, Congrès européen de médecine périnatale (ECPM), juin 2012

L'analyse du transcriptome montre une dysfonction fœto-placentaire au cours du diabète maternel.

Perimenis Pierrette; Bouckenooghe Thomas; Eury Elodie; Lobbens Stéphane; Gosset Pierre; Froguel Philippe; Storme Laurent; Vambergue Anne, SFD (Société Française de Diabétologie), mars 2012

Anomalies de la croissance fœto-placentaire dans un modèle de rate gestante diabétique.

Perimenis Pierrette; Bouckenooghe Thomas; Eury Elodie; Lobbens Stéphane; Gosset Pierre; Fontaine Pierre; Froguel Philippe; Storme Laurent; Vambergue Anne, JFRN (Journées Françaises en Recherche Néonatale), décembre 2011

Dysfonctionnement fœto-placentaire dans un modèle de rate gestante diabétique.

Perimenis Pierrette; Bouckenooghe Thomas; Eury Elodie; Lobbens Stéphane; Gosset Pierre; Fontaine Pierre; Froguel Philippe; Storme Laurent; Vambergue Anne, SFMP (Société Française de Médecine périnatale), octobre 2011

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Placental prolactin family levels are modified during gestation in the diabetic rat

Perimenis Pierrette; Moitrot Emmanuelle; Gosset Pierre; Eury Elodie; Fontaine Pierre; Vambergue Anne, IFPA (International Federation of Placenta Association), septembre 2014

Variation de l'expression placentaire du gène Decidual prolactin-related protein (*Dprp*) et des fragments antiangiogéniques de la prolactine au cours du diabète maternel.

Perimenis Pierrette; Moitrot Emmanuelle; Eury Elodie; Fontaine Pierre; Froguel Philippe; Vambergue Anne, SFD (Société Française de Diabétologie), mars 2014

Maternal diabetes is associated with increased antiangiogenic prolactin fragments and prolactin gene family expression in placenta.

Perimenis Pierrette; Bouckenooghe Thomas; Moitrot Emmanuelle; Eury Elodie; Lobbens Stéphane; Delplanque Jérôme; Gosset Pierre; Fontaine Pierre; Storme Laurent; Froguel Philippe; Vambergue Anne., DPSG (Diabete Pregnancy Study Group), décembre 2013

Feto-placental dysfunction in a rat model of gestational diabetes: a transcriptomic analyses,

Perimenis Pierrette; Bouckenooghe Thomas; Eury Elodie; Lobbens Stéphane; Gosset Pierre; Froguel Philippe; Storme Laurent; Vambergue Anne, 3rd International Brussels Pancreatic Islet Symposium, juillet 2011

PRIX

IFPA (International Federation of Placenta Association) Awards: Y.W. Loke New investigator Travel Award 2014, septembre 2014

FIGURES ET TABLES

FIGURES

[Figure 1:](#) Prévalence du diabète dans le monde en 2011

[Figure 2:](#) Répartition du diabète selon l'âge en France en 2011 des femmes ayant un diabète prégestationnel

[Figure 3:](#) Risque de mortalité fœtale et infantile en fonction du taux d'HbA1c de la mère

[Figure 4:](#) Corrélation du poids de naissance avec le risque de maladie métabolique avec l'âge, courbe en U

[Figure 5:](#) Adaptations structurelles et moléculaires pendant la vie intra-utérine conduisant aux maladies métaboliques futures

[Figure 6:](#) Modulation épigénétique de l'expression génique

[Figure 7:](#) Modifications épigénétiques aboutissant à la mise sous silence de Pdx1 en cas de RCIU à la naissance après exposition à un diabète maternel *in utero* à travers une diminution de l'acétylation (ac) des histones

[Figure 8:](#) Potentiels mécanismes des liens entre le diabète maternel et le syndrome métabolique de la descendance. En mauve, la mère et en bleu la descendance

[Figure 9:](#) « Cross-talk placentaire ». Échanges entre l'environnement maternel et l'unité fœtale à travers la barrière placentaire

[Figure 10:](#) Représentation d'une coupe sagittale structure fœto-placentaire à terme

[Figure 11:](#) Représentation de la barrière placentaire

[Figure 12:](#) Etapes du développement du placenta humain

[Figure 13:](#) Villosité choriale

[Figure 14:](#) Migration des cytotrophoblastes invasifs du TEV

[Figure 15:](#) Etapes de différenciation du cytotrophoblaste

[Figure 16:](#) Circulation intervillieuse au premier trimestre

[Figure 17:](#) Spiralisation des artères utérines sous l'action des cytotrophoblastes extra-villeux

[Figure 18:](#) Coupe embryonnaire d'un placenta à terme avec agrandissement de la zone labyrinthique

[Figure 19:](#) Développement du placenta murin (souris)

[Figure 20:](#) Circulation muine à contre-courant

[Figure 21](#): Stéroïdogénèse placentaire chez l'Homme

[Figure 22](#): Modification des voies de synthèse des triglycérides (TG), du cholestérol et des phospholipides en cas de diabète maternel

[Figure 23](#): Similitude structurale selon le nombre de résidus cystéine des protéines de la famille PRL

[Figure 24](#): Séquence nucléotidique et en acides aminés de la DPRP

[Figure 25](#): Modification des gènes impliqués dans le transport des lipides au niveau de la barrière en cas de diabète maternel

[Figure 26](#): Implication des IGFs dans le développement placentaire

[Figure 27](#): Axe glucose-insuline-IGFs placentaire dans le diabète maternel

[Figure 28](#): Implication des PPARs dans le placenta

[Figure 29](#): Hypothèse mécanistique de dysfonction placentaire induite par l'hyperglycémie

[Figure 30](#): Remodelage des artères spiralées utérines insuffisant

[Figure 31](#): Evolution de la prise alimentaire des rates pendant la gestation

[Figure 32](#): Evolution de la cétonémie des rates pendant la gestation

[Figure 33](#): Protocole expérimental

[Figure 34](#): Analyse des paramètres phénotypiques et métaboliques des rates pendant la gestation

[Figure 35](#): Analyse des taux de PRL plasmatique maternelle à différents âges gestationnels: E14, E17 et E21

[Figure 36](#): Analyse des poids fœtaux et placentaires à E14, E17 et E21

[Figure 37](#): Analyse de l'efficacité placentaire (ratio poids foetal/poids placentaire) à E14, E17 et E21

[Figure 38](#): Coupes de placentas colorées par le Periodic Acid Schiff (PAS) à E14, E17 et E21

[Figure 39](#): Expression du gène de la decidual prolactin-related protein (*Dprp*) à E14, E17 et E21

[Figure 40](#): Analyse du clivage placentaire chez le rat diabétique à E14, E17 et E21

[Figure 41](#): Coupes histologiques colorées par Hématoxyline-Éosine à E14, E17 et E21

TABLES

Table 1: Valeurs seuils de la glycémie lors de l'HGPO pour définir un DG

Table 2: Odds Ratios (OD) de l'association entre le statut diabétique de la mère et la complication maternelle, ajusté sur l'âge gestationnel de la mère

Table 3: Odds Ratios (OR) de l'association entre le statut diabétique de la mère et la complication fœtale, ajusté sur l'âge gestationnel de la mère et le sexe de l'enfant

Table 4: Membres classiques et non classiques de la famille PRL chez le rongeur

Table 5: Tissu d'expression des différents membres de la famille PRL

Table 6: Sondes pour PCR TaqMan

ABRÉVIATIONS

- 15dPGJ2: 15Deoxy Δ 12,14 ProstaglandinJ2
- ACE : *Angiotensin Converting Enzyme*
- AgRP: Agouti-Related Peptide
- ATP: Adenosine Triphosphate
- BMP-1: Bone Morphogenetic Protein-1
- CAT: catalase
- CGT: Cellule Géante Trophoblastique
- CoA: Coenzyme A
- CNAM: Caisse Nationale d'Assurance Maladie
- CNGOF: Collège des Gynécologues Obstétriciens Français
- CpG: Cytosine phosphate Guanine
- CTB: cytotrophoblaste
- DG: diabète gestationnel
- DHA: Acide Docosahexaénoïque
- DPRP: Decidual Prolactin Related Protein
- DT1: diabète de type 1
- DT2 : diabète de type 2
- E1, E2, E3... : Jour de gestation, « E » pour stade embryonnaire
- EGF: Epidermal Growth Factor
- eNOS: endothelial *Nitric Oxyde Synthase*
- FABP: Fatty Acid-Binding Protein
- FACL: *Fatty AcylCoA Ligase*
- FAT/CD36: *Fatty Acid Translocase*
- FATP: Fatty Acid-Transfer Protein
- FGF: Fibroblast Growth Factor
- Gal-1: Galectine 1
- GH: Growth Hormone
- GK: Goto-Kakizaki
- GLUT: Glucose Transporter
- GPX: *gluthatione peroxidase*
- HbA1c : hémoglobine glyquée
- HCG: Hormone Chorionique Gonadotrope
- HGPO: Hyperglycémie Provoquée par voie Orale

-HDAC: *histone déacétylase*
-HIF: Hypoxia Inducible Factor
-HMG: hyperglycémie modérée de la grossesse
-HMT: *Histone Méthyl Transférase*
-HTAG: Hypertension Artérielle Gravérique
-IADPSG: International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups
-IC: intervalle de confiance
-IGF: Insulin-like Growth Factor
-IGFBP: Insulin-like Growth Factor Binding Protein
-IL: Interleukine
-IMC: Indice de Masse Corporelle
-ip : intrapéritonéal
-IRS: Insulin Receptor Substrate
-JAK: Janus Kinase
-KO : Knock Out
-LDL : Low Density Lipoprotein
-LIPG: *Lipase endothéliale*
-LGA: Large for Gestational Age
-LPL: *lipoprotéine lipase*
-MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
-MeCP2: méthyl-CpG binding protein2
-MMP: métalloprotéase
-MT-MMP: métalloprotéase membranaire
-NAD⁺: nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
-NADH: nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
-NADP⁺: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
-NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
-NCT: nicotinamide
-NCT-STZ: traitement combiné du nicotinamide et de la streptozotocine
-NFκB: Nuclear Factor-kappa B
-NK: Natural Killer
-NO: Nitric Oxide
-NOD: Non Obese Diabetic

-NPY : neuropeptide Y
-Ob-R: récepteur de la leptine
-Ob-RS: récepteur de la leptine, forme courte
-Ob-RL: récepteur de la leptine, forme longue
-OD: Odd Ratio
-P: promoteur
-PAI: Plasminogen Activator Inhibitor
-PARP: *Poly(ADP-Ribose)Polymérase*
-PAS: Acid Periodic Schiff
-Pdx1: Pancreatic and duodenal homeobox 1
-PGE2: prostaglandine E2
-PIGF: Placental Growth Factor
-PL: hormone placentaire lactogène
-PLA2: Phospholipase A2
-PLA2G2: Phospholipase A2 du groupe II
-PLA2G5: Phospholipase A2 du groupe V
-PLP: Prolactin Like Protein
-Pol: *RNA polymérase*
-PPAR: Peroxysome Proliferator-Activated Receptor
-PPRE: Elément de Réponse du Promoteur du PPAR
-PRL: prolactine
-RCIU: Retard de Croissance Intra-Utérin
-RD: rétionopathie diabétique
-RIN : RNA Integrity Number
-RXR: Retinoid Acid Receptor
-SA: Semaine d'Aménorrhée
-SGA : Small for Gestational Age
-SFD: Société Francophone du Diabète
-SOD: *superoxide dismutase*
-SRAA: Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
-STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
-STB: Syncytiotrophoblaste
-STZ: streptozotocine

- TEV: trophoblaste extra-villeux
- TG : triglycéride
- TGF: Transforming Growth Factor
- TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
- TF: Facteur de Transcription
- uPA: urokinase plasminogen activator
- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
- VLDL: Very Low Density Lipoprotein
- ZDF: Zucker Diabetic Fatty

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	24
INTRODUCTION	27
CHAPITRE I : LE DIABÈTE MATERNEL	29
I- LE DIABÈTE EST UN PROBLÈME DE SANTE PUBLIQUE A L'ÉCHELLE MONDIALE	30
A- LE DIABÈTE DE TYPE 1	31
B- LE DIABÈTE DE TYPE 2	32
C- LE DIABÈTE GESTATIONNEL.....	33
II-COMPLICATIONS MATERNO-FCETALES D'UN DIABÈTE MATERNEL A COURT	
TERME	35
A- COMPLICATIONS MATERNELLES	35
B- COMPLICATIONS FCETALES D'UN DIABÈTE MATERNEL	36
III- COMPLICATIONS A LONG TERME POUR L'ENFANT NÉ DE MERE DIABÉTIQUE	40
A- RISQUE DE SURPOIDS ET D'OBESITE	40
B- RISQUE D'ANOMALIE DE LA TOLÉRANCE AU GLUCOSE	42
C- RISQUE D'HYPERTENSION ARTÉRIELLE	44
CHAPITRE II : ROLE PRIMORDIAL DE L'ENVIRONNEMENT PÉRINATAL	
DANS LA PROGRAMMATION DE LA VIE FUTURE	47
I- LA PROGRAMMATION FCETALE	48
A- HYPOTHESE DE BARKER ET LA PROGRAMMATION PRÉCOCE	48
1- Historique	48
2- Croissance intra-utérine et troubles métaboliques	49
3- « Théorie du phénotype économe »	50
4- Le « mismatch » environnemental	51
B- HYPOTHÈSE D'HATTERSLEY OU « HYPOTHÈSE DE L'INSULINE FCETALE »	52
II- MÉCANISMES DE LA PROGRAMMATION FCETALE DANS LE DIABÈTE	
MATERNEL	53
A- ALTÉRATIONS DES SYSTÈMES ENDOCRINES.....	53
1- Effets périphériques	53
a- Altérations du pancréas endocrine.....	53
b- Altérations de l'axe gluco-insuline-IGFs	55
2- Effets centraux : altérations des neuropeptides hypothalamiques	55
B- MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES	57
CHAPITRE III : BASES DE LA PLACENTATION CHEZ L'HOMME	
ET LES MURINS	64
STRUCTURE ET DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA CHEZ L'HOMME	65
I- STRUCTURE DU PLACENTA À TERME	65
II- DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA DURANT LA GROSSESSE	66
A- LE DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DU PLACENTA	66
B- LE TROPHOBLASTE VILLEUX	68
C- LE TROPHOBLASTE EXTRA-VILLEUX (TEV)	70
D- LA DÉCIDUE.....	72

III- ANGIOGENÈSE PLACENTAIRE ET INVASION THROPHOBLASTIQUE.....	72
STRUCTURE ET DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA CHEZ LE RONGEUR.....	76
I- STRUCTURE DU PLACENTA.....	76
II- DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA DURANT LA GESTATION.....	77
III- ANGIOGENÈSE PLACENTAIRE ET INVASION TROPHOBLASTIQUE.....	81
CHAPITRE IV : LES HORMONES PLACENTAIRES.....	84
I- LES HORMONES STÉROÏDES.....	85
A- LA PROGESTÉRONE.....	85
B- LES OESTROGÈNES.....	86
II- L’HORMONE CHORIONIQUE GONADOTROPE.....	86
III- LA FAMILLE DES GROWTH HORMONES (GH)/CHORIONIQUES SOMATROTROPHIQUES(CS) PLACENTAIRES.....	87
IV- LA FAMILLE PRL.....	88
A- LA FAMILLE PRL DANS LE PLACENTA CHEZ L’HOMME ET LE RONGEUR.....	88
1- Historique.....	88
2- Membres classiques de la famille PRL utéroplacentaires.....	90
3- Membres non classiques de la famille PRL utéroplacentaires.....	90
4- Similitude structurale.....	90
5- « Patterns » d’expression des membres de la famille PRL.....	91
a- Expression cellulaire exclusive dans les cellules trophoblastiques.....	92
b- Expression cellulaire double (cellules trophoblastiques et du spongiotrophoblaste; cellules du spongiotrophoblaste et cellules déciduales).....	92
c- Expression tissulaire triple (décidue, trophoblaste, spongiotrophoblaste).....	93
d- Expression cellulaire déciduale.....	93
6- Régulation des membres de la famille PRL.....	93
7- Transport et distribution tissulaire de la famille PRL.....	93
8- Fonctions biologiques de la famille PRL dans le placenta.....	94
B- L’HORMONE LACTOGÈNE PLACENTAIRE.....	95
C- LA PRL DÉCIDUALE.....	95
1- Structure de la PRL déciduale.....	96
2- Production au cours de la grossesse.....	96
3- Mode d’action.....	96
4- Fonction biologique.....	97
5- Régulation.....	97
6- Maturation de la PRL.....	98
a- Enzymes de clivage de la PRL.....	98
La cathepsine D.....	98
Les métalloprotéases (MPs).....	99
La BMP-1.....	100
b- Implication clinique connue des vasoinhibines.....	100
Implication dans la prééclampsie.....	100
Implication dans le diabète.....	100
D- LA DPRP AU SEIN DU PLACENTA.....	101
1- Structure.....	101
2- Localisation.....	102
3- Fonction biologique.....	102
V- LA LEPTINE PLACENTAIRE.....	103
VI- L’ADIPONECTINE PLACENTAIRE.....	103

CHAPITRE V : IMPACT DU DIABÈTE MATERNEL SUR L'UNITÉ FOETO-PLACENTAIRE	105
I- TRANSFERT ACCRU DE NUTRIMENTS VERS LE FŒTUS	106
A- AFFLUX DE GLUCOSE	106
1- Lors d'une grossesse physiologique	106
2- Dans le cadre d'un diabète maternel	106
B- AFFLUX DE LIPIDES	107
1- Lors d'une grossesse physiologique	107
2- Dans le cadre d'un diabète maternel.....	108
C- AFFLUX D'ACIDES AMINES	110
1- Lors d'une grossesse physiologique	110
2- Dans le cadre d'un diabète maternel.....	111
II- MÉCANISMES ADAPTATIFS AU SEIN DE L'UNITE PLACENTAIRE	111
A- MODIFICATIONS HORMONALES PLACENTAIRES	111
1- Dysrégulation de l'axe glucose-IGFs-insuline placentaire	111
a- Axe glucose-IGFs-insuline placentaire au cours d'une grossesse physiologique	111
b- Dysrégulation dans le diabète maternel.....	113
2- Dysrégulation de la production de la leptine placentaire.....	115
a- La leptine au sein de l'unité foeto-maternelle au cours d'une grossesse physiologique	115
b- Dysrégulation de la leptine placentaire dans le diabète maternel	117
B- MODIFICATIONS DES MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION ET DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE	117
1- Modifications des médiateurs de l'inflammation	117
a- La réponse inflammatoire au cours de la grossesse physiologique	117
b- La réponse inflammatoire dans le diabète maternel	118
2- Modification des médiateurs de la réponse immunitaire.....	118
a- La réponse immunitaire au cours de la grossesse physiologique	118
b- Modification de la réponse immunitaire dans le diabète maternel.....	118
3- Stress oxydatif	119
C- MODIFICATIONS DE L'ANGIOGENÈSE PLACENTAIRE.....	119
D- MODIFICATIONS DES ÉCHANGES EN OXYGÈNE	121
E- MODIFICATIONS DE LA RÉGULATION PLACENTAIRE PAR LES PPARs	121
1- Rôle des PPARs dans le placenta.....	121
a- Les récepteurs peroxisome proliferator-activated (PPARs).....	121
b- Rôle dans la régulation du métabolisme lipidique et de l'inflammation placentaires	122
c- Rôle dans la placentation.....	123
2- Modifications de régulation par les PPARs placentaires dans le diabète maternel	124
a- Modifications du métabolisme lipidique via les PPARs.....	125
b- Modification des médiateurs de l'inflammation via les PPARs	
c- Modifications de la placentation via les PPARs.....	125
III- MÉCANISMES ADAPTATIFS AU SEIN DE L'UNITE FŒTALE	128
A- LA MACROSOMIE	128
B- LE RCIU.....	129

OBJECTIFS	131
------------------------	-----

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	133
--------------------------------------	-----

PARTIE I	
ANALYSE DES GENES IMPLIQUÉS DANS LA CROISSANCE FOETO-PLACENTAIRE DANS LE DIABETE MATERNEL.....	134
I-OBJECTIFS.....	137
1^{ER} ARTICLE.....	138
II-PRINCIPAUX RESULTATS	139
III-CONCLUSION	142
PARTIE II	
ANALYSE DE CERTAINS MEMBRES DE LA FAMILLE PRL A E14, E17 ET E21	144
I-MATÉRIEL ET MÉTHODES	147
2^{ÈME} ARTICLE	146
A- ANIMAUX.....	147
B- COMPOSITION DES GROUPES EXPERIMENTAUX.....	147
C- PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.....	147
D- ANALYSE STATISTIQUE	150
II-PRINCIPAUX RESULTATS	151
III-CONCLUSION	162
DISCUSSION GÉNÉRALE	163
CONCLUSION GÉNÉRALE	176
ANNEXE	178
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	180

AVANT-PROPOS

Le maintien de l'homéostasie glucido-lipidique dépend de facteurs génétiques, des apports alimentaires (qualitatifs et quantitatifs) et de facteurs environnementaux. Il y a, au cours de la grossesse, de plus en plus de données dans la littérature mettant en évidence le rôle primordial de l'environnement périnatal dans la croissance de l'unité foeto-placentaire et dans la programmation de la vie future (Barker DJ, 1993).

L'exposition à des conditions anormales durant le développement fœtal induirait des phénomènes adaptatifs réversibles ou irréversibles avec des conséquences à court et à long terme, notamment augmentation du risque de maladies telles que le diabète ou l'obésité (Dabelea D et al, 2001). Un environnement intra-utérin modifié, affecte le développement de certains organes et donc leur fonction et pourrait ainsi programmer la survenue de maladies chroniques dans l'enfance mais aussi à l'âge adulte (Hales CN et al, 2001).

Il est maintenant reconnu que la période prénatale représente une fenêtre critique de vulnérabilité à l'environnement puisque les principaux processus biologiques et physiologiques sont programmés à long terme durant cette période (Glucman PD et al, 2009).

De nombreuses situations physiopathologiques peuvent être associées à un environnement périnatal modifié. On retrouvera, la prééclampsie où on observe une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments au fœtus, se traduisant par un retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Karanam VL et al, 2014). Dans d'autres conditions observables pendant la grossesse, le fœtus peut être exposé à une malnutrition maternelle (excès ou défaut de nutrition), à un excès de glucose. Le diabète maternel, tout comme la malnutrition (restriction calorique, protéique ou ligature des artères utérines), est caractérisé par une diminution à la fois du flux sanguin et du transfert des nutriments utéro-placentaires (Holemans K et al, 2003).

La dysfonction placentaire reste une cause majeure d'anomalies de croissance foeto-placentaire dans la physiopathologie du diabète maternel. Pourtant, peu d'études se sont intéressées au placenta. Des travaux décrivant des changements histopathologiques placentaires ont été rapportés en cas de diabète maternel. Cependant, les mécanismes physiopathologiques exacts des liens entre la dysfonction, les gènes et la croissance foeto-placentaires restent encore imprécis et doivent être élucidés.

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le compartiment placentaire en analysant l'expression des gènes impliqués dans la croissance fœto-placentaire afin de déterminer des facteurs prédictifs des anomalies de croissance au cours du diabète maternel.

C'est au sein de l'unité de recherche EA 4489 « Environnement Périnatal et Croissance » dirigée par le Professeur Laurent STORME et en lien avec l'orientation thématique du laboratoire que les principaux travaux qui seront présentés dans cette thèse ont été réalisés. Les axes de recherche de cette unité sont l'étude de l'altération de la croissance périnatale par un environnement périnatal modifié. Les travaux ont été complétés au sein de l'UMR 8199 de l'EGID dirigée par le Pr Philippe FROGUEL, dont l'orientation est la génétique autour du diabète et de l'obésité.

INTRODUCTION

Dans cette partie introductive, nous exposerons tout d'abord dans le chapitre I notre contexte, autrement dit, les données essentielles cliniques et épidémiologiques du diabète maternel, et ses conséquences maternelles et fœtales à court et long terme.

Puis dans un deuxième temps, il sera fait un exposé sur l'état actuel des connaissances sur le rôle de l'environnement périnatal dans la qualité de la vie à l'âge adulte dans le chapitre II.

Enfin, nous décrirons dans les chapitres III, IV et V, les éléments essentiels de la placentation, puis ceux de l'hormonologie placentaire chez l'Homme et les murins avant d'exposer l'impact du diabète maternel sur l'unité foeto-placentaire et les mécanismes adaptatifs mis en place respectivement par le fœtus et le placenta.

CHAPITRE I

LE DIABÈTE MATERNEL

Le diabète maternel qu'il soit prégestationnel de type 1 ou de type 2, ou gestationnel reste à ce jour associé à des complications materno-fœtales à court et long termes. La grossesse chez la patiente diabétique reste une grossesse à haut risque. L'objectif de la déclaration de St Vincent présenté en 1989 était de réduire la morbidité materno-fœtale chez les patientes diabétiques dans les 5 ans afin d'atteindre celle de la population non diabétique (Diabetes Care and research in Europe : the Saint Vincent déclaration, 1990). A ce jour, cet objectif n'a pas été atteint puisque le risque de complications materno-fœtales est 2 à 5 fois plus élevé chez les patientes diabétiques de type 1 (DT1) comparativement à la population non diabétique (Colstrup M et al, 2013).

I- LE DIABÈTE EST UN PROBLÈME DE SANTÉ PUBLIQUE À L'ÉCHELLE MONDIALE

Le diabète touche 366 millions de personnes dans le monde en 2011 et touchera 551 millions de personnes en 2030, soit une augmentation de 50.7% (Whiting DR et al, 2011). En France, on estime la prévalence du diabète à 4.6 % soit 3.4 millions environ de personnes (Bonaldi C et al, 2011) (*Figure 1*).

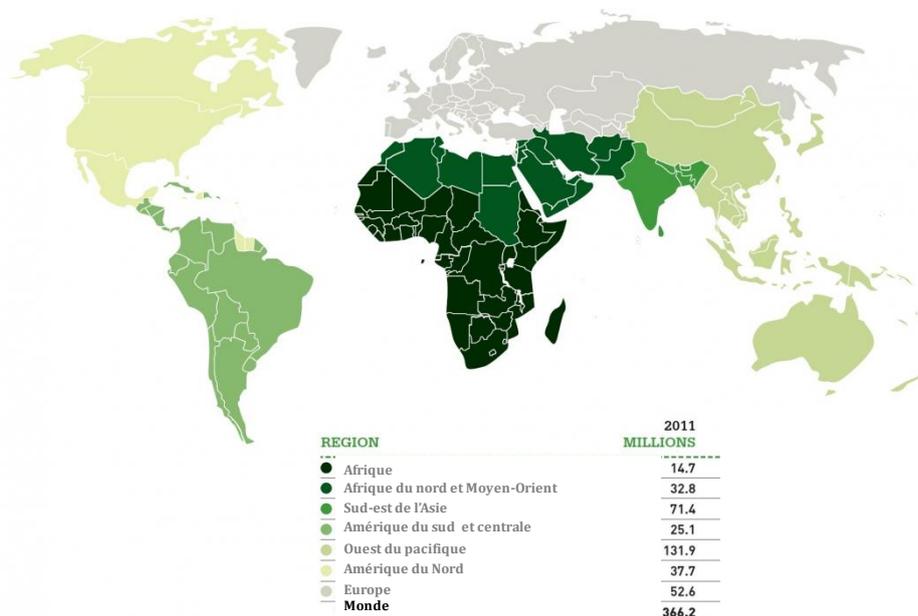


Figure 1 Prévalence du diabète 20-79 ans dans le monde en 2011, d'après l'International Diabetes Federation (IDF), 2011

Le diabète peut être présent à toutes les tranches de la vie quel que soit le type de diabète. En âge de procréer, la prévalence du DT1 est plus importante que celle du diabète de type 2 (DT2 chez les femmes âgées de moins de 30 ans. Cette tendance s'inverse à partir de 30-34 ans, avec une prévalence de DT2 plus forte à un âge plus tardif (Billionnet C et al, 2014) (*Figure 2*).

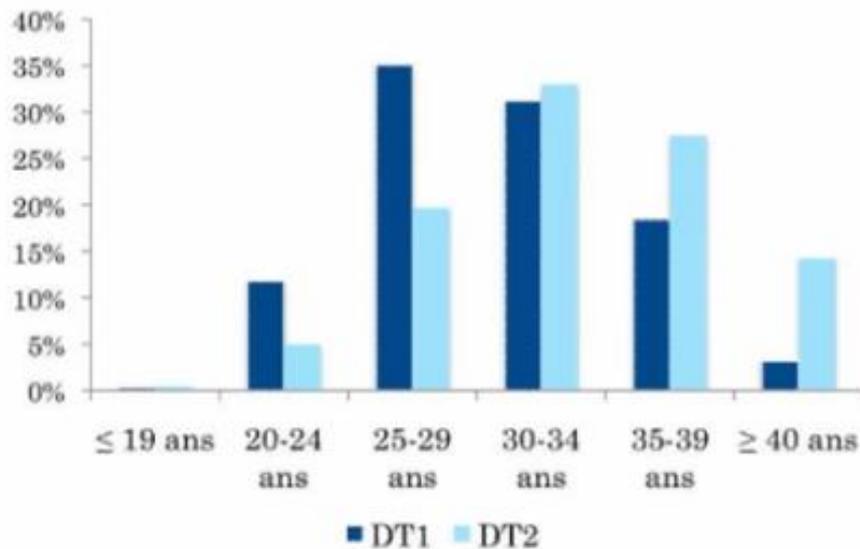


Figure 2 Répartition du diabète selon l'âge en France en 2011 des femmes ayant un diabète prégestationnel, d'après Billionnet C et al, 2014
 IC : intervalle de confiance ; DT1 : diabète de type 1; DT2 : diabète de type 2

A- LE DIABÈTE DE TYPE 1

Le DT1 affecte 227 000 personnes en France soit environ 8% des diabétiques en 2011 (Assogba FG et al, 2014). Il se caractérise par la destruction sélective auto-immune de la cellule bêta des îlots de Langerhans qui sécrète l'insuline. L'incidence des femmes diabétiques de type 1 a augmenté de 50-70 % ces 20 dernières années (Walkinshaw SA, 2001). Des données épidémiologiques récentes montrent que le DT1 affecte 0.16 % des grossesses en France en 2011 (Billionnet C et al, 2014).

B- LE DIABÈTE DE TYPE 2

Le DT2 représente quant à lui, la forme la plus fréquente de diabète à partir de 30 ans et atteint surtout des sujets ayant plus de 40 ans. Il résulte de la conjonction de plusieurs gènes de susceptibilité, dont l'expression dépend de facteurs environnementaux, tels la consommation excessive de graisses saturées, de sucres rapides et la sédentarité (Bonaldi C et al, 2011). La prédisposition héréditaire est importante dans le DT2: lorsque l'un des parents est touché, le risque pour les enfants est de 30%, lorsque les deux parents sont atteints, le risque est d'environ 50% (Rathmann W et al, 2013).

Près de 90% des sujets diabétiques de type 2 présentent ou ont présenté une surcharge pondérale. L'obésité augmente le risque d'apparition d'un DT2, de 2 à 10 fois selon le chiffre de l'indice de poids corporel (IMC) (Bonaldi C et al, 2011; Rathmann W et al, 2013). En raison de l'augmentation de l'obésité et du surpoids, chez les femmes enceintes, comme dans la population générale, la prévalence du DT2 au cours de la grossesse est en augmentation significative (Callec R et al, 2013). En effet, en France, comme l'ont montré les études « Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité » (ObEpi) successives, la prévalence de l'obésité chez les adultes a augmenté rapidement entre 1997 et 2009: de près de 6% par an (Charles MA et al, 2008). La prévalence de l'obésité a plus particulièrement augmenté pendant cette période chez les femmes nées après la fin des années 1960, c'est-à-dire chez les femmes actuellement en âge de procréer (Diouf I et al, 2010). Ainsi, entre 2006 et 2009, les 25-34 ans et les femmes sont les deux catégories pour lesquelles la prévalence de l'obésité a augmenté le plus fortement.

Si, en France en 2004, seulement 1/3 des femmes enceintes diabétiques présentaient un DT2, aujourd'hui, les premières données exhaustives nationales sur le diabète pré-gestationnel montrent des prévalences du DT1 et du DT2 équivalentes chez les femmes enceintes (Billionet C et al, 2014; Callec R et al, 2013). Le DT2 affecte 0.24 % des grossesses en France en 2011 (Billionet C et al, 2014).

La gravité du DT2 pendant la grossesse tient en particulier à son caractère asymptomatique et sournois car il peut rester inconnu jusqu'à un stade avancé de la grossesse et diagnostiqué le plus souvent au moment du dépistage du diabète gestationnel (DG) ou lors d'une complication obstétricale (malformations fœtales, macrosomie). On estime la prévalence

du DT2 méconnu à 30% (Cundy T et al, 2000) et à 15 % la proportion des DG qui ne sont en fait que des DT2 méconnus (Schaefer-Graf UM et al, 2002). Cette prévalence a tendance à augmenter du fait de l'augmentation de la prévalence de l'obésité et de l'âge de procréation des femmes de plus en plus tardif (Boulot P, Diabetes and Pregnancy group, 2003).

C- LE DIABÈTE GESTATIONNEL

Le DG est défini comme un trouble de la tolérance au glucose survenu ou reconnu pour la première fois pendant la grossesse. Il est associé avec des complications maternelles, fœtales et néonatales en l'absence de prise en charge thérapeutique. Les critères diagnostiques ont d'abord été établis il y a plus de 40 ans par O'Sullivan (O'Sullivan JB et al, 1964), le but étant alors d'identifier les femmes enceintes qui étaient à risque de développer un DT2 après la grossesse. Depuis des années, le manque de consensus international sur les critères de diagnostic du DG faisait l'objet de controverses qui entretenaient le débat. Idéalement, la définition des critères de dépistage et de diagnostic devrait prendre en compte la réduction des risques materno-fœtaux au cours de la grossesse et au moment de l'accouchement, ainsi que la réduction des risques à long terme pour la mère et l'enfant.

Les résultats de l'étude Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO), publiés en 2008 ont montré qu'il existait une relation continue entre la glycémie maternelle et la morbidité materno-fœtale ne permettant pas de déterminer de seuils diagnostiques évidents mais que ceux-ci devaient être déterminés par consensus (Metzger BE et al, 2008). En 2008, l'International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups consensus panel (IADPSG) a produit des recommandations internationales (Hadar E et al, 2010). En France, la Société francophone du Diabète (SFD) et le Collège des Gynécologues Obstétriciens français (CNGOF) ont proposé des recommandations adaptées à la France et qui sont les suivantes :

Le dépistage du DG est un dépistage sur facteurs de risque et non plus systématique. Il est effectué en présence d'au moins un des facteurs de risque suivants:

- ❖ Indice de Masse Corporelle (IMC) pré-gestationnel $\geq 25 \text{ kg/m}^2$
- ❖ Age maternel ≥ 35 ans
- ❖ Antécédent personnel de DG ou familial de diabète du 1er degré ou de macrosomie à la naissance

Il consiste à effectuer une glycémie à jeun dès la première consultation prénatale. Si cette glycémie à jeun est ≥ 0.92 g/l, le diagnostic de DG est posé. Si elle est < 0.92 g/l, ou si elle n'a pas été effectuée à la première consultation, une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) à 75 g de glucose est réalisée entre 24 et 28 semaines d'aménorrhée. Si on retrouve une valeur anormale parmi ces 3 mesures de glycémie (*Table 1*), le diagnostic de diabète gestationnel est établi. Si la glycémie à jeun est supérieure ou égale à 1.26 g/l (7 mmol/l), un diagnostic de diabète de type 2 préalable à la grossesse est posé.

Glycémie avant et après charge orale de 75 g de glucose		
A jeun	≥ 0.92 g/l	≥ 5.1 mmol/l
1 heure après charge orale de glucose	≥ 1.80 g/l	≥ 10 mmol/l
2 heures après charge orale de glucose	≥ 1.53 g/l	≥ 8.5 mmol/l

Table 1 Valeurs seuils de la glycémie lors de l'HGPO pour définir un DG d'après Hadar E et al, IADPSG, 2010

La prévalence du DG est le plus souvent comprise dans les études entre 2 et 6% si on se base sur les anciens critères diagnostiques (Carpenter MW et al, 1982). Dans l'étude HAPO, la prévalence du DG est à 17.8 % si on utilise les nouveaux critères définis par l'IADPSG (Hadar E et al, 2010). En France, la mise en œuvre des nouveaux critères est associé à une augmentation de la prévalence atteignant les 18% (vs 6 % avant la mise en place de ces recommandations) (Wery E et al, 2014). Ceci est en partie expliqué par l'augmentation des femmes en âge de procréer avec des facteurs de risque mais également en raison de l'abaissement des seuils diagnostiques du diabète gestationnel.

Les mécanismes physiopathologiques du DG impliquent d'une part un déficit partiel de l'insulinosécrétion et d'autre part une insulino-résistance inhérente à la grossesse. La physiopathologie du DG est très proche de celle du diabète de type 2 laissant ainsi penser qu'il s'agit en réalité de la même pathologie mais à des stades différents. Le DG ne serait finalement qu'un état de " pré-diabète de type 2 ".

De nombreuses études ont en effet montré que ces femmes ont un risque très élevé (risque multiplié par 7) de devenir DT2 après la grossesse (Bellamy L et al, 2009). L'étude DIAGEST 2, notamment, est une étude prospective du Nord-Pas-de Calais s'étant intéressé au devenir métabolique de 1009 femmes caucasiennes ayant fait un DG ou une hyperglycémie modérée de la grossesse (HMG) (466 DG, 322 HMG et 221 témoins) ayant participé à l'étude DIAGEST (Vambergue A et al, 2000) 6 ans et 11 ans après. Parmi celles-ci, 178 patientes présentant un DG ont été revues à 6 et 11 ans. La prévalence du DT2 à 6 ans était de 30.3% et celle de 11 ans à 42.7 %, soit une progression de 12.4% en 5 ans. Les facteurs prédictifs d'un DT2 à 11 ans sont : l'antécédent familial de diabète, l'ethnie, le DG, l'IMC avant la grossesse > 27 kg/m², la glycémie à jeun > 5,5 mmol/L ou 4 valeurs anormales lors de l'HGPO réalisée entre 24 et 28 semaines d'aménorrhée (SA) (critères de Carpenter et Coustan) (Carpenter MW et al, 1982), et l'insulinothérapie pendant la grossesse (Vambergue A et al, 2008).

II- COMPLICATIONS MATERNO-FŒTALES D'UN DIABÈTE MATERNEL À COURT TERME

A- COMPLICATIONS MATERNELLES

Les risques maternels classiquement associés au diabète maternel sont l'hypertension artérielle gravidique (HTAG), définie par des pressions artérielles systoliques et/ou diastoliques supérieures ou égales à 140/90 mmHg après 20 semaines d'aménorrhée (SA), et la prééclampsie, définie par une HTAG associée à une protéinurie supérieure ou égale à 0,3 g par 24h. Le lien de causalité entre l'hyperglycémie et la survenue d'une pathologie hypertensive de la grossesse est cependant difficile à évaluer car de nombreux facteurs de confusion coexistent (âge élevé, obésité, hypertension artérielle chronique, terrain familial) si bien que les résultats des études de cohortes sont parfois discordants concernant le sur-risque de pathologies hypertensives gravidiques notamment en cas de diabète gestationnel (Evers IM et al, 2004 ; Hadar E et al, 2010).

La prévalence de la prééclampsie chez la femme DT1 varie selon les études de 12 à 20%, soit 5 fois supérieure à celle de la population générale (Evers IM et al, 2004; Jensen et al, 2010). Elle est de 9 % en cas de DG (Hadar E et al, 2010). Dans la population Française,

elle est estimée à 9.2 % chez la femme DT1 et 5.9 % chez la femme DT2 (1.5 % dans la population générale) (Billionnet C et al, 2014). Son risque est augmenté en cas de néphropathie ou de rétinopathie diabétiques préalables à la grossesse et est corrélé au chiffre d'hémoglobine glyquée (HbA1C) des 2^{ème} et 3^{ème} trimestres, donc de l'équilibre glycémique (Jensen DM et al, 2010). La prévalence est de 30-40% en cas de microalbuminurie (Jensen DM et al, 2010), de 50% en cas de défaillance de la fonction rénale (Gordon M et al, 1996).

Les données épidémiologiques de la population Française concernant les risques maternels notamment le risque de prééclampsie et de césarienne au cours du diabète prégestationnel de type 1 et 2 lors de la grossesse ont été analysés en 2011 (*Table 2*) (Billionnet C et al, 2014). Le risque maternel majeur du diabète maternel quelque soit le type est la prééclampsie. Elle est une maladie de l'endothélium maternel dont l'origine est placentaire (Shen F et al, 2014).

COMPLICATIONS	DT1		DT2
	OR (IC 95%) DT1 vs pas de diabète	OR (IC 95%) DT1 vs DT2	OR (IC 95%) DT2 vs pas de diabète
CESARIENNE	4,30 (3,84-4,82)	1,48 (1,27-1,78)	2,93 (2,67-8,21)
PREECLAMPSIE/ ECLAMPSIE	6,73 (5,58-8,16)	1,60 (1,20-2,12)	3,87 (3,19-4,69)

Table 2 Odds Ratios (OD) de l'association entre le statut diabétique de la mère et la complication maternelle, ajusté sur l'âge gestationnel de la mère, d'après Billionnet C et al, 2014

IC : intervalle de confiance ; DT1 : diabète de type 1; DT2 : diabète de type 2

B- COMPLICATIONS FŒTALES D'UN DIABÈTE MATERNEL

Les complications fœtales du diabète maternel sont nombreuses avec un risque accru de morbidité périnatale et de malformations fœtales. Les complications les plus graves restent à ce jour l'excès de mortalité ainsi que le risque accru de malformations fœtales. Il est classiquement admis que le diabète prégestationnel a 2 types d'effets sur le développement fœtal: un effet tératogène, précoce, produisant l'« embryopathie diabétique », et un effet métabolique plus

tardif, constituant la «fœtopathie diabétique», avec le phénotype classique de l'«enfant né de mère diabétique» avec ses complications obstétricales et néonatales bien connues (*Table 3*) (Billionnet C et al, 2014).

COMPLICATIONS	DT1		DT2
	OR (IC 95%) DT1 vs absence de diabète	OR (IC 95%) DT1 vs DT2	OR (IC 95%) DT2 vs absence de diabète
MACROSOMIE	6,98 (6,08-8,01)	1,71 (1,41-2,08)	3,90 (3,48-4,42)
LESIONS DU PLEXUS BRACHIAL ET FRACTURE CLAVICULE (nés par voie basse, PN > 4 kg)	7,34 (4,18-12,90)	2,57 (1,01-6,51)	2,70 (1,34-5,47)
DETRESSE RESPIRATOIRE (Mort-nés exclus)	2,61 (2,01-3,37)	1,23 (0,86-1,76)	1,91 (1,48-2,47)
ASPHYXIE PERINATALE	3,31 (2,17-5,06)	1,29(0,72-2,37)	2,46 (1,82-3,72)
MALFORMATIONS (cardiaques, majeures, mineures)	4,41 (2,98-6,53)	1,33 (0,75-2,35)	3,20 (2,18-4,70)
DECES DU NOUVEAU-NE	2,18 (1,40-3,40)	-	2,98 (2,18-4,07)
PREMATURITE (33-37 SA)	6,61 (5,92-7,39)	1,80 (1,54-2,09)	3,57 (3,25-3,93)

Table 3 Odds Ratios (OR) de l'association entre le statut diabétique de la mère et la complication fœtale, ajusté sur l'âge gestationnel de la mère et le sexe de l'enfant, d'après Billionnet C et al, 2014

IC : intervalle de confiance ; DT1 : diabète de type 1; DT2 : diabète de type 2

La mortalité périnatale (englobant la mortalité fœtale et celle des nourrissons de moins d'un an (infantile)) reste encore de nos jours d'actualité en cas de grossesse compliquée de diabète maternel prégestationnel. Son risque est proportionnel à l'équilibre glycémique maternel périconceptionnel. Des travaux récents ont montré une augmentation du risque de mortalité fœtale de 2% et de mortalité infantile de 3% pour une augmentation de 0,13% du taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c), et ce uniquement si le taux d'HbA1c était supérieur à 6,6 % (*Figure 3*) (Tennant PW et al, 2014).

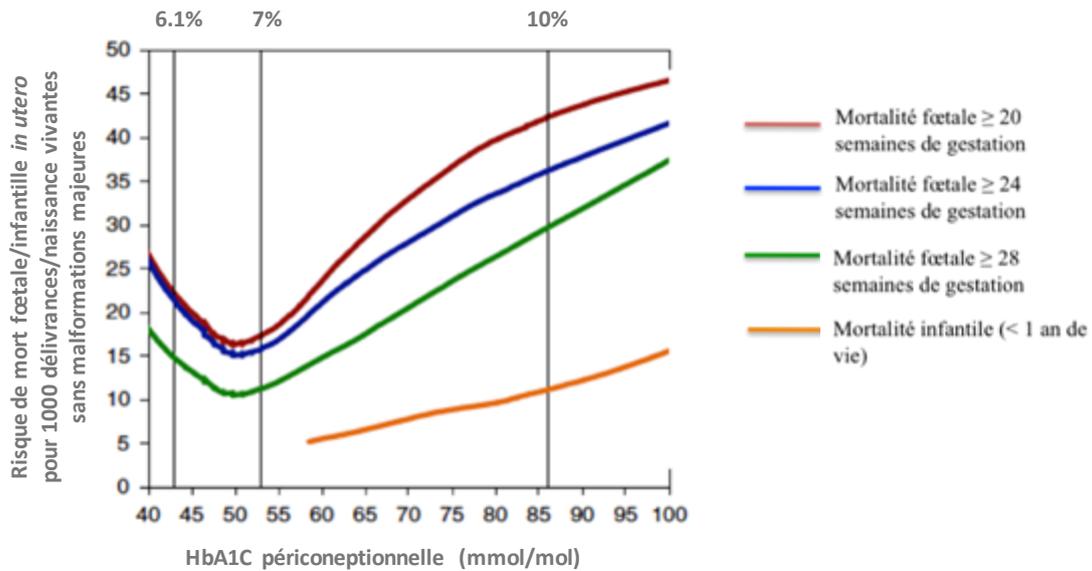


Figure 3 : Risque de mortalité fœtale et infantile en fonction du taux d'HbA1c de la mère, d'après Tennant PW et al, 2014

La seconde complication fœtale majeure en cas de diabète maternel est celle des malformations congénitales avec une prévalence liée au niveau d'équilibre glycémique prégestationnel de la mère. En effet, le taux de malformations congénitales reste supérieur à celui de la population non diabétique que ce soit pour le DT1 ou le DT2, surtout si l'équilibre glycémique maternel n'est pas atteint (Boulot P et al, 2003; Colstrup M et al, 2013). Il convient donc de programmer ces grossesses, à savoir obtenir une normoglycémie à la conception (HbA1c) la plus basse possible puisqu'il a été démontré qu'une prise en charge préconceptionnelle optimale diminue le taux de malformations congénitales de 7,4 à 1,9% (Wahabi HA et al, 2012).

En dehors de ces 2 complications fœtales sévères, la plus souvent retrouvée est celle de la macrosomie dans plus de 40-50% dans le diabète prégestationnel malgré une optimisation de l'équilibre métabolique (Walkinshaw SA, 2001) et dans 12 à 30% dans le DG alors qu'elle n'est retrouvée que dans 10% dans la population générale (HAPO study, 2009).

Dans la littérature, on distingue le terme de macrosomie et le terme de "*large for gestational age*" (LGA). La macrosomie se définit par une valeur du poids de naissance dont le seuil varie selon les auteurs entre 4000 et 4500 g. Cette définition ne prend pas en considération

l'excès de croissance fœtale en fonction du terme. Le terme LGA correspond selon les auteurs à un poids de naissance supérieur ou égal au 90^{ème} percentile ou supérieur à +2DS (>97^{ème} percentile) pour l'âge gestationnel, Cette notion plus précise prend en considération le terme de la naissance et permet d'identifier les nouveaux-nés prématurés avec excès de croissance fœtale. Cependant, les courbes permettant d'évaluer la croissance du nouveau-né sont très nombreuses et établies à partir des données anthropométriques relevées dans des populations différentes. De façon récente, il a été proposé des courbes pour la macrosomie (LGA) ajustées au poids, à la taille de la mère, à la parité du sexe de l'enfant et à l'âge gestationnel sur le modèle de Gardosi et al. (Gardosi J et al, 1995) pour le retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Sjaarda LA et al, 2014).

Quel que soit le terme utilisé, macrosomie ou LGA, il désigne une constatation clinique mais ne définit pas systématiquement une situation pathologique. La macrosomie du nouveau-né de mère diabétique se caractérise par un excès de masse grasse, une augmentation de la masse musculaire, une organomégalie sans augmentation de la taille du cerveau. A l'inverse de la macrosomie constitutionnelle ou symétrique de mère non diabétique avec une croissance harmonieuse de leur poids, leur taille et leur périmètre crânien sans autre anomalie associée. Selon l'hypothèse de Pedersen, cette macrosomie est la conséquence de l'hyperinsulinisme fœtal secondaire à l'hyperglycémie maternelle (Pederson J et al, 1954). Les mécanismes physiopathologiques seront détaillés dans le chapitre conséquences fœto-placentaires du diabète maternel.

Le diabète maternel peut se compliquer plus rarement d'un RCIU dans 3% de cas (Glinianaia SV et al, 2012) et quasiment de façon systématique dans les modèles animaux ce qui rend difficile la confrontation des données cliniques et des données chez l'animal. Il se traduit par un fœtus de taille insuffisante pour l'âge gestationnel, inférieure au 10^{ème} percentile des courbes de référence ajustées sur les facteurs confondants (Gardosi J et al, 1995). Il peut être harmonieux (ou symétrique) quand la pathologie survient en début de grossesse ou dysharmonieux (ou asymétrique, périmètre crânien normal tandis que le poids, la taille, le périmètre abdominal sont réduits) quand le RCIU est plutôt d'origine vasculaire.

En pratique clinique, il est retrouvé dans des situations particulières qui sont les patientes diabétiques avec essentiellement des complications microvasculaires du diabète (néphropathie, rétinopathie) ou en cas d'association avec une hypertension artérielle soit préexistante à la

grossesse soit gravidique. Le mécanisme physiopathologique sera détaillé dans le chapitre conséquences fœto-placentaires du diabète maternel.

III- COMPLICATIONS A LONG TERME POUR L'ENFANT NÉ DE MÈRE DIABÉTIQUE

Nous savons actuellement que l'exposition fœtale à l'environnement maternel hyperglycémique fait partie des multiples facteurs de risque du syndrome métabolique de l'adulte. C'est à partir de ces données qu'est né le concept de « programmation » ou « déterminisme fœtal ». Les premières études ont souligné le lien entre la restriction de croissance fœtale et le risque de développer des troubles nutritionnels et métaboliques à l'âge adulte. Toutefois, il semble actuellement que l'excès d'apport nutritionnel *in utero*, comme dans le diabète et l'obésité maternels expose également aux mêmes risques. Par contre, les données concernant le devenir des enfants naissant de mères ayant un DT1 ou DT2 restent à ce jour, beaucoup plus rares.

A- RISQUE DE SURPOIDS ET D'OBÉSITÉ

Il est important de bien distinguer les études qui ont eu lieu dans des populations particulières comme les Indiens Pimas, de celles des populations où la composante génétique était moins importante. Le facteur de risque le plus important d'obésité chez les enfants dans la population Pima est l'exposition à un diabète maternel *in utero* indépendamment de l'obésité maternelle et du poids de naissance. En effet, chez les enfants nés de mères diabétiques, le risque d'obésité dans l'enfance ou l'adolescence (jusqu'à 20 ans) est de 58%, alors qu'il n'est que de 17% pour les enfants nés d'une mère non diabétique et de 25% si le diabète s'est révélé qu'après la grossesse (Dabelea D et al, 2001). Au sein d'une même fratrie, toujours chez les indiens Pima, la prévalence de l'obésité était plus importante chez les frères/soeurs exposés *in utero* au diabète maternel que chez ceux qui ne l'étaient pas. Autrement dit, les frères/soeurs nés avant le diagnostic du diabète de leur mère avaient moins de risque d'être obèses que ceux nés pendant/après que le diabète de leur mère ait été révélé (Dabelea D et al, 2000). Enfin, le risque d'obésité était plus élevé chez les enfants nés de mères diabétiques en comparaison aux enfants nés de pères diabétiques, suggérant une programmation intra-utérine par

l'hyperglycémie maternelle (Dabelea D et al, 2001). Cependant, en raison de facteurs génétiques très spécifiques chez les indiens Pima, ces résultats ne peuvent pas être extrapolés directement à d'autres populations notamment à la population générale.

Dans d'autres populations diverses à forte ou faible incidence de diabète, autres que les indiens Pima, on retrouve aussi cette association entre le diabète maternel et l'obésité future du descendant, même après ajustement sur le poids de naissance, l'histoire familiale, l'IMC maternel et l'âge gestationnel (Clausen TD et al, 2008). Ce surpoids prédominait sur l'adiposité viscérale dans des études anthropométriques (Vaarasmajki M et al, 2009). D'autres auteurs retrouvaient une corrélation entre le taux de glycémie à jeun maternel et le risque d'obésité dans l'enfance d'enfants de 5-7 ans, multiplié par 2 au delà d'une glycémie de 5,3 mmol/l (Hillier TA et al, 2007). Le risque d'obésité ultérieure de l'enfant exposé au diabète maternel a également été évalué dans le cas d'un DT1 maternel. Weiss et al ont rapporté qu'à partir de 5 à 15 ans, l'IMC de la descendance de mère DT1 était supérieur à celui de la descendance de mère non diabétique avec une obésité dans 30% des cas vs 10% et corrélé positivement à la glycémie à jeun maternel pendant la grossesse. Dans cette étude 5% des enfants nés de mère DT1 étaient devenus diabétiques entre l'âge de 5 et 15 ans (Weiss et al, 2000). Le risque de surpoids à l'âge adulte est donc présent quelque soit le type de diabète maternel, DT1, DT2 ou DG, lors d'une exposition *in utero*.

Ce qui est intéressant également de noter est le lien entre le poids de la mère pendant la grossesse et la survenue ultérieure d'obésité du descendant. Une étude Finlandaise faisait état d'un risque d'obésité abdominale accru chez des adolescents de 16 ans lorsque ceux-ci étaient exposés *in utero* à une obésité maternelle, plus particulièrement lorsque celle-ci était associée à un DG. Cependant elle n'était pas retrouvée en cas de DG seul sans obésité (Pirkola J et al, 2010). Toutefois, on notera que ces résultats peuvent être faussés si on ajuste sur l'IMC préconceptionnel de la mère qui diminue considérablement le risque de surpoids futur du descendant. L'intérêt de cet ajustement est controversé dans la littérature. Certains défendent l'idée que le surpoids et le diabète maternel seraient l'expression d'une même pathologie, et dans ce cas, il y aurait surajustement (Kim SY et al, 2011; Philips LH et al, 2011). Quoi qu'il en soit, toutes ces données incitent à tenir compte du surpoids maternel en tant que facteur de risque de surpoids dans la descendance.

La question qui reste débattue à ce jour est de savoir si la condition de macrosomie fœtale de mère diabétique est nécessaire au surpoids ou à l'obésité développés ultérieurement. Catalano *et al.* ne mettait pas en évidence de relation significative entre la macrosomie et le risque d'obésité chez des enfants âgés de 7 et 11 ans. En revanche, il retrouvait une relation significative entre le pourcentage de masse grasse à la naissance et le risque futur d'obésité (Catalano PM *et al.*, 2009). Les enfants nés d'une mère ayant des troubles modérés de la régulation glucidique sans DG vrai, avaient 20% de plus de masse grasse que les enfants dont la mère ne présentait pas de trouble de la tolérance glucidique (Catalano PM *et al.*, 2003). Ceci suggère une altération précoce du métabolisme lipidique chez les enfants, dès qu'il y a une exposition à des concentrations en glucose élevées *in utero*. Cette relation entre macrosomie et risque d'obésité dans l'enfance n'était pas retrouvée dans une étude longitudinale de suivi sur 11 ans qui comparait quatre groupes de patients : enfants macrosomes exposés à un DG, enfants macrosomes non exposés à un DG, enfants eutrophes de mères DG et enfin des enfants eutrophes de mères normoglycémiques (Boney CM *et al.*, 2005). Alors que l'étude sur la même cohorte en 1999 avait montré une prévalence plus importante de l'obésité chez les enfants nés macrosomes de mères avec DG comparativement aux autres groupes, cette différence n'était pas retrouvée lors de l'étude chez les enfants à 4 et 7 ans (Vohr BR *et al.*, 1999).

B- RISQUE D'ANOMALIE DE LA TOLÉRANCE AU GLUCOSE

Chez les Indiens Pima, le DG était associé à la survenue fréquente et précoce d'un diabète chez l'enfant. Le risque de diabète chez le descendant dépendait du statut glycémique de la mère: parmi les descendants âgés de 20 à 24 ans, 45% de ceux dont la mère était diabétique avant ou pendant la grossesse, présentaient un DT2 ultérieurement. Par contre, cette prévalence de DT2 dans la descendance était beaucoup plus basse respectivement à 9% et 1,4% lorsque leur mère développait un diabète après la grossesse ou pas du tout. Pour les adultes plus âgés (entre 25 et 34 ans), la prévalence de DT2 atteignait 70% lorsqu'ils avaient été exposés au diabète de leur mère *in utero* (Dabelea D *et al.*, 2001).

Ce lien entre le risque de développer un DT2 chez le descendant selon son exposition ou non au diabète maternel *in utero* permet d'évaluer le rôle propre de l'environnement intra-utérin. En effet, ces enfants portent en théorie la même prédisposition génétique mais diffèrent quant à leur exposition intra-utérine au diabète de leur mère. Les Indiens Pima nés après le diagnostic de diabète de leur mère avaient un risque 3,7 fois plus élevé de développer eux-

mêmes un diabète et un IMC significativement plus élevé comparativement à leurs frères ou soeurs nés avant le diagnostic de leur mère. Alors qu'aucune différence n'est notée quand on compare les frères et soeurs nés avant et après le développement d'un diabète chez leur père (Dabelea D et al, 2000). Ces résultats, montrent que, chez les indiens Pima, l'exposition au diabète *in utero* augmente le risque de développer un DT2 chez le descendant en plus de celui attribué aux facteurs génétiques.

Plusieurs cohortes prospectives, conduites dans des populations diverses à forte ou faible incidence de diabète, se sont intéressées aux anomalies de la tolérance au glucose dans la descendance de femmes ayant eu un DG (Krishnaveni GV et al, 2005; Tam WH et al, 2010). A l'exception d'une seule (Tam WH et al, 2010), toutes les études prospectives mettent en évidence un excès de risque d'anomalies glucidiques dans la descendance de femmes ayant eu un DG. Cette étude s'est intéressée à la tolérance glucidique chez des enfants de 8 ans selon que leur mère ait présenté ou non un trouble de la tolérance glucidique au cours de leur grossesse (préférentiellement à type d'intolérance au glucose). Il n'est pas mis en évidence de différence entre les deux groupes. Cependant d'une part, les mères présentaient une intolérance au glucose et non un DG vrai et d'autre part il n'y avait que 6 enfants qui avaient présenté un trouble de la tolérance glucidique. Ces troubles étaient à la fois mis en évidence chez les enfants mais également chez les adolescents. Il y a tout lieu de penser que la fréquence de ces troubles soit majorée avec le vieillissement de ces cohortes.

Par contre, peu de données sont décrites dans la littérature sur les conséquences de l'exposition fœtale au DT1 maternel chez la descendance. Il a été rapporté que l'exposition fœtale au DT1 maternel était associée à une augmentation de l'intolérance au glucose en rapport avec une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose oral et en intraveineux et non à une diminution de l'action de l'insuline. Cette altération de la sécrétion d'insuline s'intègre dans un contexte d'altération globale du pancréas avec une diminution de la freination du glucagon en réponse au glucose (Sobngwi E et al, 2003). Ces auteurs avaient mis en évidence une diminution de la réserve fonctionnelle rénale chez les sujets exposés suggérant que l'exposition fœtale à l'hyperglycémie ou à ces anomalies métaboliques associées pouvaient induire des altérations multiviscérales (Abi Khalil C et al, 2010). Les mécanismes évoqués étaient des altérations de l'angiogénèse et/ou des phénomènes épigénétiques (Fetita LS et al, 2006). Récemment, Clausen *et al.* ont rapporté chez des individus âgés en moyenne de 22 ans ayant été exposés *in utero* au DT1 maternel, une prévalence de développer ultérieurement un

DT2 de 2%. Ces sujets exposés avaient un risque de 41% d'être hypertendus, pression artérielle systolique supérieure à 130 mmHg. Sur le plan méthodologique, il est important de préciser que dans cette cohorte danoise, les descendants de mères DT1 étaient comparés à des sujets issus de la population générale ou à des descendants de mères ayant eu un DG, donc une prédisposition génétique au DT2 (Clausen TD et al, 2008).

C- RISQUE D'HYPERTENSION ARTÉRIELLE

Chez les Indiens Pima, les enfants nés d'une mère ayant présenté un diabète pendant la grossesse ont une tension artérielle systolique plus élevée que les enfants nés d'une mère ayant présenté un diabète après la grossesse et ceci indépendamment de l'obésité (Bunt JC et al, 2005).

Cinq cohortes prospectives se sont intéressées aux valeurs de la pression artérielle comme élément du syndrome métabolique dans la descendance des femmes atteintes de DG. Toutes ces études rapportent des valeurs tensionnelles systoliques plus élevées de quelques millimètres de mercure chez les descendants de mères ayant eu un DG. Cependant, on notera une grande variabilité dans la significativité des résultats de ces différentes études vraisemblablement en raison d'une faible puissance statistique. Dans l'étude de *Tam et al.*, les enfants nés de mère ayant eu une intolérance au glucose au cours de leur grossesse, ont une tension artérielle diastolique et systolique plus élevée que celles des enfants du groupe témoin dès l'âge de 8 ans (Tam WH et al, 2010). Une méta-analyse reprenant les résultats de 13 études a confirmé que les enfants de mères diabétiques avaient une tension artérielle systolique plus élevée que les enfants de mères contrôles notamment les garçons. Il existe également des différences dues au type de diabète maternel. Par contre, il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre la tension artérielle systolique de l'enfant et l'IMC maternel prégestationnel (Aceti A et al, 2012).

POINTS-CLÉS

- La grossesse chez la patiente diabétique reste une grossesse à risque.
- La prévalence du diabète de type 2 et du diabète gestationnel est en augmentation.
- Malgré les progrès de l'obstétrique et de la diabétologie, la morbidité materno-fœtale associée au diabète prégestationnel reste nettement plus élevée que celle de la population non diabétique.
- L'absence de programmation de ces grossesses explique en partie l'excès de malformations congénitales.
- En dehors du risque de mortalité et de malformations, les anomalies de croissance restent très fréquentes laissant supposer qu'il doit exister d'autres facteurs que l'hyperglycémie maternelle dans la genèse de ces anomalies.
- Des études de suivi du devenir de ces enfants nés de mères hyperglycémiques sont en faveur d'une transmission transgénérationnelle de l'obésité, du diabète de type 2 et des pathologies cardio-vasculaires, via une exposition précoce *in utero*.

VERS LE CHAPITRE II

La morbidité materno-fœtale notamment les anomalies de croissance associée au diabète maternel reste élevée malgré une prise en charge métabolique laissant supposer qu'il existe d'autres facteurs que l'hyperglycémie maternelle expliquant la genèse de ces anomalies. Si les conséquences à la naissance de l'hyperglycémie maternelle sont maintenant bien démontrées, les mécanismes ainsi que les conséquences à plus long terme notamment des anomalies de croissance restent encore largement à explorer. Ce lien entre la glycémie maternelle pendant la grossesse et les anomalies de croissance et risques ultérieurs pour l'enfant, pourrait s'expliquer par une programmation précoce.

Dans le [chapitre II](#), nous évoquerons le rôle principal de l'environnement périnatal dans la programmation de la vie future. Nous décrirons certains des mécanismes de la programmation fœtale dans le diabète maternel.

CHAPITRE II

RÔLE PRIMORDIAL DE L'ENVIRONNEMENT PÉRINATAL DANS LA PROGRAMMATION DE LA VIE FUTURE

Au vu du chapitre précédent, il semble clair que le diabète maternel sensibilise la descendance au développement de troubles métaboliques dès la petite enfance et ce jusqu'à l'âge adulte, suggérant la mise en place de mécanismes de programmation fœtale.

D'un point de vue biologique, le concept de programmation fœtale de maladies survenant chez l'adulte n'est pas surprenant. En partant du zygote, la croissance et le développement de l'organisme implique d'importantes phases de prolifération cellulaire, suivie de phases successives de différenciation qui vont progressivement réduire le potentiel de différenciation des cellules. Durant cette période de croissance et différenciation coordonnées, on peut aisément imaginer que des altérations du milieu intérieur puissent avoir des conséquences permanentes.

I- LA PROGRAMMATION FŒTALE

On retrouve 2 hypothèses majeures derrière les associations entre petit poids de naissance et risque de développer un diabète ou une obésité ultérieurs.

❖ L'hypothèse de Barker implique l'environnement nutritionnel mais aussi postnatal aboutissant à une programmation de certaines fonctions par des modifications morphologiques ou fonctionnelles liées à des mécanismes épigénétiques.

❖ L'hypothèse d'Hattersley suggère que certains génotypes prédisposeraient à une croissance (médiée par l'insuline) réduite et pourraient donc conduire à une sécrétion d'insuline altérée ou à une insulino-résistance avec un risque plus élevé de diabète de type 2 ultérieur.

A- HYPOTHÈSE DE BARKER ET LA PROGRAMMATION PRÉCOCE

1- Historique

C'est dans les années 70 que Forsdahl A. établit pour la première fois que la pauvreté (et la sous-nutrition qui s'ensuit) durant l'enfance avec une vie plus prospère par la suite à l'adolescence était corrélée positivement à une mortalité cardiovasculaire à l'âge adulte. Ces

travaux concernaient une cohorte Norvégienne âgée de 40 à 69 ans avec au sein de cette génération une forte mortalité infantile entre 0 et 9 ans (Forsdahl A, 1977).

Il a fallu attendre 1986 pour que Hales et Barker émettent l'hypothèse de l'existence d'une programmation fœtale au cours de la grossesse du syndrome métabolique (troubles de la tolérance glucidique, surcharge pondérale et maladies cardiovasculaires) à l'âge adulte par l'intermédiaire d'un environnement intra-utérin modifié. Cette hypothèse a été proposée dans un premier temps après la constatation d'un taux élevé de mortalité infantile au début du XX^{ème} siècle en Angleterre et au pays de Galles associé à un taux élevé de décès à l'âge adulte. Les enfants nés hypotrophes avec une sous-nutrition maternelle anténatale et/ou exposés à une sous-nutrition postnatale qui survivaient à cet état semblaient présenter plus de risques de développer une maladie coronarienne et un trouble du métabolisme glucidique à l'âge adulte (Barker DJ et al, 1986). Ceci suggèrait que le risque de développer une maladie métabolique est programmé de façon très précoce sans toutefois identifier de mécanismes biologiques

2- Croissance intra-utérine et troubles métaboliques

C'est dans les années 90, qu'on commence à évoquer la possibilité de l'association du syndrome métabolique à l'âge adulte avec des troubles de la croissance intra-utérins (Barker DJ et al, 1993). Un RCIU, est associé avec le développement d'une hypertension artérielle, de maladies cardiovasculaires, de dyslipidémie, d'obésité, d'intolérance au glucose et de diabète de type 2 (Barker DJ et al, 1997). Bien qu'il y ait eu de nombreux écrits sur les risques accrus du syndrome métabolique chez les nourrissons nés « petits par rapport à l'âge gestationnel », des enquêtes récentes montrent une augmentation des risques d'obésité à l'adolescence et à l'âge adulte chez les nourrissons nés « gros par rapport à l'âge gestationnel » ou macrosomes. Une macrosomie fœtale apparaissant dans des situations de suralimentation, de diabète maternel est également associée à l'âge adulte au développement d'un syndrome métabolique. Les enfants nés macrosomes ont deux fois plus de risques d'être obèses et de développer un diabète de type 2 ou des pathologies cardiovasculaires à long terme (Gamborg M et al, 2007).

Ces 2 troubles de la croissance intra-utérine, à savoir la macrosomie et le RCIU pourtant aux antipodes l'un de l'autre, évoluent paradoxalement vers un phénotype similaire à l'âge adulte. Ils affichent des dysrégulations métaboliques communes comme l'obésité, les troubles de la tolérance glucidique. De larges études de cohorte corrélant le risque de maladie

métabolique avec le poids de naissance comme les études chez les indiens Pima (McCance DR et al, 1994) montrent une courbe en "U" (*Figure 4*). Une altération de la croissance du fœtus que ce soit une macrosomie ou un RCIU conduit à l'âge adulte à une augmentation du risque métabolique assez similaire. Les nouveaux-nés hypotrophes à la naissance peuvent présenter un phénomène qui succède au processus d'adaptation auquel ils ont été confrontés pendant la vie fœtale, le « catch-up » ou rattrapage de croissance avec une vitesse de croissance et une augmentation de leur masse grasse supérieures pour l'âge et le sexe pouvant être mise en cause dans le syndrome métabolique présenté à l'âge adulte (Ibanez L et al, 2006).

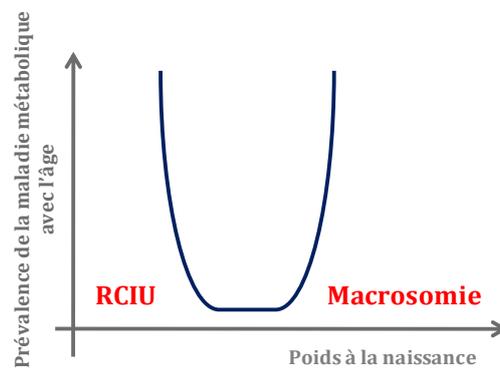


Figure 4 Correlation du poids de naissance avec le risque de maladie métabolique avec l'âge, courbe en U

3- « Théorie du phénotype économe »

La période intra-utérine est pour le développement et la plasticité de la plupart des organes, une période critique. Les observations de Barker sur l'association RCIU et syndrome métabolique à l'âge adulte (Barker DJ et al, 1993) ont donné naissance à l'hypothèse du phénotype économe ou "thrifty phénotype". Cette hypothèse suggère une susceptibilité du fœtus à son environnement intra-utérin à condition que cet environnement soit délétère et dans le cas de cette hypothèse, qu'il soit appauvri. Durant des périodes de restriction nutritionnelle, le fœtus, en cours d'organogénèse, pour assurer sa survie, s'adapte à son environnement intra-utérin. Ainsi, il redirige les nutriments disponibles vers des organes critiques comme le cerveau ou le poumon au détriment d'autres organes comme les muscles, le foie, le pancréas ou les reins (Hales CN et al, 1992) avec pour conséquence un risque accru d'insulino-résistance voire de diabète de type 2 à l'âge adulte (Hales CN et al, 2001).

Beaucoup d'études animales se sont initialement focalisées sur des modèles aboutissant à des restrictions de croissance (régimes pauvres en protéines ...). Néanmoins, comme le montre la *Figure 5*, d'autres types de modifications de l'environnement materno-fœtal peuvent aussi résulter d'un diabète maternel ou d'une obésité. Certains tissus pourront alors être programmés, notamment le tissu musculaire squelettique et adipeux, le pancréas et le cerveau, tous impliqués dans la régulation métabolique (Warner MJ et al, 2010).

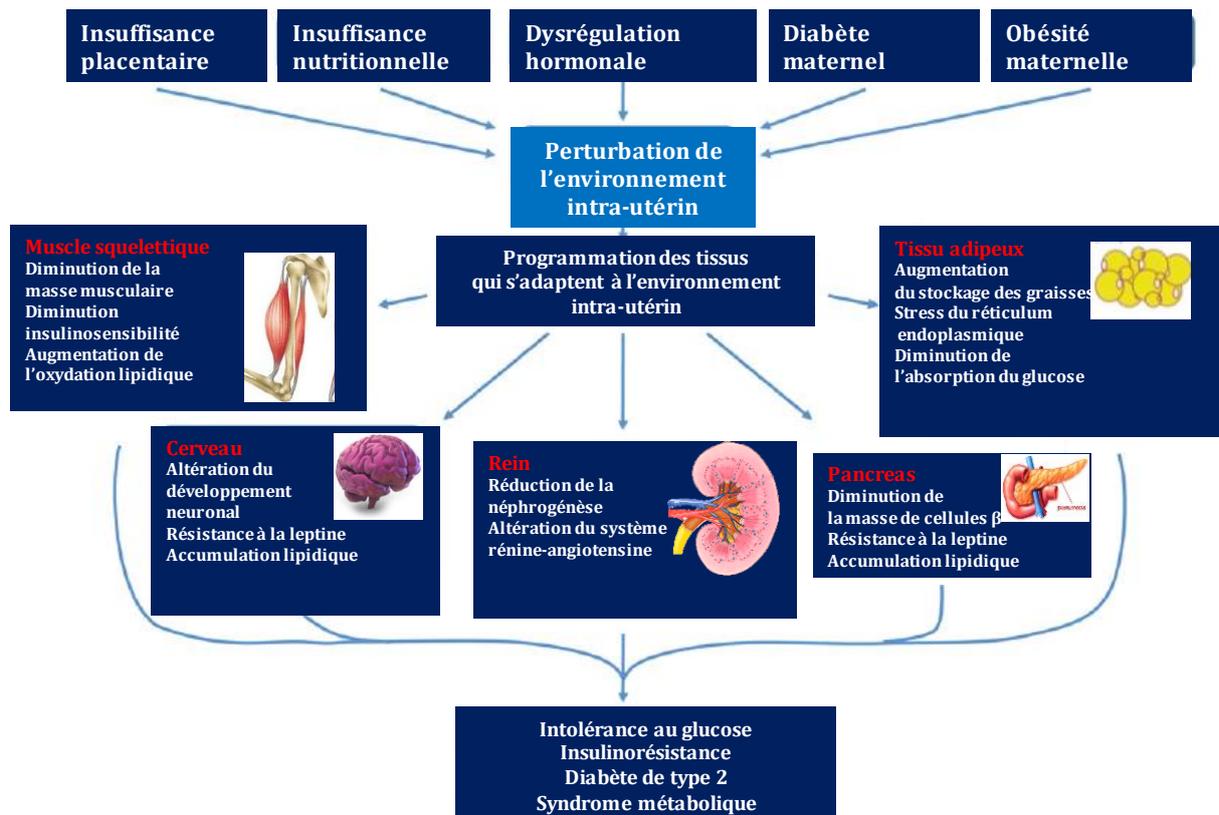


Figure 5 Adaptations structurelles et moléculaires pendant la vie intra-utérine conduisant aux maladies métaboliques futures, d'après Warner MJ et al, 2010

4- Le "mismatch" environnemental

Le fœtus adapte sa croissance à l'apport nutritionnel intra-utérin et ce durant toute la gestation pour sa survie. De nombreuses études ont été conduites parmi des cohortes exposées

à des périodes de famine *in utero* à différents temps de la gestation, comme celle des Pays-Bas ou "The Dutch Famine" (1944-1945) jusqu'à l'âge adulte (Ravelli AC et al, 1998). Une exposition *in utero* précoce à une sous-nutrition maternelle expose à une prévalence d'obésité augmentée à l'âge adulte de 80 % et ce malgré un poids de naissance tout à fait normal (Ravelli GP et al, 1976). Une exposition plus tardive (3ème trimestre) risque d'induire un petit poids de naissance, une intolérance au glucose et un risque moindre d'obésité avec une prévalence de 40% (Ravelli AC et al, 1998). Le "mismatch" environnemental, c'est la discordance nutritionnelle entre l'environnement pré- et post-natal, autrement dit entre une situation de sous-nutrition fœtale pendant la gestation suivie d'un état plus prospère après la naissance avec suralimentation, auxquelles l'enfant exposé doit s'adapter.

B- HYPOTHÈSE D'HATTERSLEY OU "HYPOTHÈSE DE L'INSULINE FŒTALE"

L'hypothèse d'Hattersley propose que l'altération de la croissance fœtale *in utero* et le développement d'un DT2 à l'âge adulte du fœtus exposé sont deux phénotypes du même génotype, autrement dit le "thrifty phénotype" ou phénotype économe serait la conséquence du " thrifty genotype". Elle stipule que les mêmes facteurs génétiques qui induiraient une insulino-résistance ou une anomalie de l'insulinosécrétion conduisant au DT2 à l'âge adulte pourraient aussi réguler et altérer la croissance fœtale *in utero*. Il y aurait ainsi un lien entre le petit poids de naissance *in utero* et le développement ultérieur d'un DT2 (Frayling TM et al, 2001; Hattersley AT et al, 1999).

De nombreuses observations du développement foetal en cas de désordres monogéniques affectant l'insulinosécrétion ou l'insulino-résistance décrites dans la littérature supportent cette hypothèse. Ainsi, des mutations du gène de la glucokinase, induisant une dysrégulation modérée des cellules bêta avec apparition d'un DT2 très tôt chez le sujet jeune, ont été impliquées dans les troubles de croissance pendant la vie intra-utérine. Si la mutation était présente chez la mère diabétique, le fœtus était macrosome par hyperinsulinisme foetal. Si la mutation était présente chez le fœtus, celui-ci développait un RCIU avec hypoinsulinisme foetal. Ces données étaient en faveur d'une influence génétique sur l'insulinosécrétion et *in fine* sur la croissance fœtale intra-utérine. Néanmoins, l'étude d'autres polymorphismes génétiques

candidats n'a pas permis à ce jour de conforter cette hypothèse, vraisemblablement parce que ces polymorphismes ne sont pas fonctionnels (Beltrand J et al, 2008).

II- MÉCANISMES DE LA PROGRAMMATION FŒTALE DANS LE DIABÈTE MATERNEL

Durant le développement, on retrouve des variations physiologiques des concentrations hormonales qui permettent des modifications morphologiques et fonctionnelles indispensables à la préparation de la vie extra-utérine (Plagemann A et al, 2004). A ces variations physiologiques peuvent néanmoins s'ajouter des variations non physiologiques, résultant en particulier des modifications du milieu intra-utérin, qui, en fonction du moment, de l'amplitude et de la nature du changement, auront ou non des conséquences à long terme.

Les conséquences à long terme de la présence en quantité non physiologique de certaines hormones durant des périodes critiques incluraient notamment le développement de l'obésité et du diabète de type 2. Les deux principales hormones de la régulation métabolique pour lesquelles de tels phénomènes ont été démontrés chez l'animal sont l'insuline et la leptine avec des modifications au niveau des tissus périphériques et des modifications des circuits centraux neuroendocrines (Cottrell EC et al, 2007).

A- ALTÉRATIONS DES SYSTÈMES ENDOCRINES

Les systèmes endocrines fœtaux permettent au fœtus de s'adapter à des situations critiques pour assurer sa survie. Ils régulent la croissance et le développement des tissus fœtaux en modulant l'expression génique de certains gènes et en régulant la synthèse hormonale foeto-placentaire.

1- Effets périphériques

a- Altérations du pancréas endocrine

En fin de grossesse, chez l'homme comme chez le rat, le fœtus est capable de réguler lui-même sa glycémie. Dans un environnement intra-utérin diabétique, le fœtus doit composer avec un afflux important de glucose. Cet excès de glucose entraîne chez le fœtus des changements

développementaux des cellules bêta de Langerhans qui dépendent de la sévérité du diabète maternel.

Chez le rat, un diabète maternel modéré (glycémie de 20% supérieure à la normale) va stimuler le pancréas foetal et va induire une insulino-résistance avec une augmentation du contenu pancréatique en insuline, une augmentation de la sécrétion d'insuline et va favoriser la prolifération des cellules bêta. Au contraire, un diabète plus sévère de plus de 20 mmol/l de glycémie entraîne une hypertrophie et une désorganisation des îlots, une diminution du contenu en insuline et une dégranulation des cellules bêta fœtales chez le rat. Ces fœtus présentent des taux d'insuline très bas et une réduction de la réponse cellulaire de l'îlot pancréatique en réponse à l'hyperglycémie. Ces mécanismes peuvent conduire à une altération du développement du pancréas endocrine et à une dysfonction précoce des cellules bêta (Van Assche FA et al, 2001).

Ces altérations endocrines de l'insuline pourraient être indispensables à la survie fœtale. Ainsi, un état d'insulino-résistance pourrait être bénéfique à la croissance du fœtus par l'effet anabolique de l'insuline qui redirige le glucose des muscles squelettiques vers les organes vitaux comme le cerveau ou le placenta (Ozanne SE et al, 1998). Par contre, cet état d'insulino-résistance peut-être paradoxalement délétère quant à l'augmentation du risque de diabète de type 2 futur. La diminution de la sensibilité à l'insuline pourrait stimuler la cellule bêta des îlots pancréatiques à produire plus d'insuline pour maintenir un état normoglycémique, contribuant à un épuisement pancréatique secondaire.

Nous savons que la macrosomie fœtale est souvent liée à la présence d'un hyperinsulinisme fœtal. Il est suggéré qu'un hyperinsulinisme fœtal relatif peut être un précurseur de l'obésité dans l'enfance. Entre 5 et 9 ans, l'insulinémie à jeun est augmentée dans la descendance de mère diabétique chez les indiens Pima. Ce hyperinsulinisme est corrélé à la prise de poids pendant cette période. L'hyperinsulinisme ne se retrouve pas dans les tranches d'âge plus âgées (Pettitt DJ et al, 1991). Dans une autre étude de Chicago, l'insuline mesurée dans le liquide amniotique, d'origine fœtale, est directement corrélée avec le contenu fœtal en insuline, qui lui-même est corrélé au glucose circulant, reflet de l'équilibre glycémique maternel. Cette étude démontre une corrélation directe entre le degré de sévérité du diabète maternel, l'hyperinsulinisme fœtal et *in fine* le degré d'obésité dans l'enfance ou l'adolescence (Silverman BL et al, 1991).

b- Altérations de l'axe glucose-insuline-IGFs

Les Insulin-like growth factors (IGFs) sont d'importants médiateurs de la croissance pré et postnatale chez l'humain comme chez le rongeur et leur production est indépendante de l'hormone de croissance, la Growth Hormone (GH) (Rosenfeld RG et al, 1997). Les deux formes d'IGFs, IGF-1 et IGF-2, peuvent se lier au récepteur de l'insuline mais avec une affinité moindre que l'insuline. Les IGFs se complexent aussi avec une large famille de protéines, les IGFBPs qui peuvent réguler l'accès des IGFs à leur récepteur.

Les deux formes d'IGFs jouent un rôle dans l'embryogénèse précoce mais seul IGF-2 a un rôle en fin de gestation. Il est proposé en se basant sur des études animales, que l'axe régulant la croissance fœtale serait glucose-insuline-IGF1. L'IGF1 fœtale est sécrétée en réponse à l'insuline fœtale qui elle-même est régulée par le transfert placentaire de glucose. L'IGF-1 a un rôle, à la fois, métabolique et anabolique. Il augmente la production hépatique de glucose, favorise la lipolyse et la synthèse protéique dans le muscle squelettique (Agrogiannis GD et al, 2014).

En cas de RCIU, les concentrations plasmatiques de l'IGF-1 et de l'insuline sont réduites à la naissance, puis se normalisent dans le post-partum (Cianfarani S et al, 1998). Il y a probablement un lien entre les diminutions de l'IGF1 et de l'insuline constatées *in utero* et le phénomène de "catch up" pondéral des enfants nés hypotrophes de mère diabétique. Les tissus déplétés en IGF1 et en insuline pendant la vie fœtale développent un mécanisme d'insulinorésistance due à l'exposition soudaine à ces 2 hormones à plus fortes concentrations dans le post-partum. Cette insulinorésistance apparaît comme un mécanisme de défense face à un apport nutritionnel qui devient brutalement suffisant après la naissance pour protéger les tissus d'une éventuelle hypoglycémie (Cianfarani S et al, 1999). Le système postnatal des IGFs est alors surstimulé et peut expliquer en partie la prise de poids post-natale des enfants présentant un RCIU à la naissance et *in fine* un syndrome métabolique à l'âge adulte.

2- Effets centraux: altérations des neuropeptides hypothalamiques

L'homéostasie énergétique réside dans l'équilibre entre prise alimentaire et dépense énergétique. La rupture de ce point d'équilibre se traduira par l'apparition d'une surcharge

pondérale si suralimentation ou un état de dénutrition si sous-alimentation. L'hypothalamus est le chef d'orchestre de la régulation de la prise alimentaire avec de nombreux peptides en son sein impliqués dans cette régulation. On citera les neuropeptides orexigènes comme le neuropeptide Y (NPY); l'Agouti-related peptide (AgRP) et les anorexigènes comme la leptine.

En 1994, l'étude de modèles animaux d'obésité a permis de mettre en évidence le gène *ob* codant pour la leptine. La leptine est une protéine de 16-kDa avec une séquence de 167 acides aminés. Elle régule la balance énergétique et le poids corporel en agissant sur l'hypothalamus, renfermant les centres de la faim et de la satiété. Elle est sécrétée sans modifications post-traductionnelles et sa production a lieu essentiellement dans le tissu adipeux blanc sous l'effet de nombreux facteurs de régulation. Parmi ceux-là, on citera l'insuline, l'état nutritionnel. Mais elle est aussi impliquée dans le métabolisme glucidique, lipidique, la reproduction ainsi que dans la réponse immunitaire. La leptine fœtale est augmentée en cas de diabète maternel que ce soit chez la mère ou le fœtus (Higgins MF et al, 2013).

Une des hypothèses intéressantes relative aux changements hormonaux de la descendance exposée *in utero* à un diabète maternel après la naissance fut émise par Plagemann et al en 2005. Leur travaux ont fait état de modifications permanentes de la masse grasse et des circuits neuronaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'appétit avec surexpression des neuropeptides orexigènes NPY et AgRP dans la descendance de mère diabétique dans la période périnatale après la naissance. Ceci contribuerait à une hyperphagie dont la conséquence sera une surcharge pondérale ultérieure en cas de suralimentation après la naissance (Franke K et al, 2005). On notera que chez les fœtus avec RCIU issus de rates gestantes traités par la STZ et rendues diabétiques, l'expression du gène *Npy* était diminuée dans le tissu hypothalamique (Singh BS et al, 1997). Cette donnée apporte des arguments supplémentaires pour le mécanisme du "catch up" pondéral dans l'enfance des descendants hypotrophes de mères diabétiques. L'expression du NPY hypothalamique est variable et dépend des variations nutritionnelles de l'environnement que subit le fœtus/nouveau-né. En cas de RCIU, il est exposé *in utero* à une carence nutritionnelle et doit s'adapter ex-utéro à une alimentation beaucoup plus riche.

Pour conclure, un certain nombre d'hormones peuvent programmer ou reprogrammer des systèmes de régulation si elles sont présentes en quantité non physiologiques durant des

périodes clés du développement encore appelées « périodes critiques ». Cette reprogrammation pourrait passer par des modifications épigénétiques. Un certain nombre d'éléments qui laissent penser que les modifications épigénétiques durant ces périodes critiques peuvent avoir un impact à long terme sont présentés ci-après.

B- MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES

Les stades très précoces de la grossesse sont cruciaux. Des facteurs impliqués dans les périodes de pré-implantation et préconceptionnelle jouent un rôle important dans la vie future du fœtus exposé. Des changements épigénétiques sont possibles en cas de diabète maternel qui prennent place avant la conception (Fleming TP et al, 2004). Faire le lien entre les facteurs environnementaux et nutritionnels sur le contrôle de l'expression génique reste un véritable challenge. Le concept de l'épigénétique a émergé pour promouvoir un mécanisme potentiel de différence de susceptibilité face à une maladie, ainsi qu'un lien entre les facteurs de l'environnement et les conséquences de cette maladie.

La présence de ces marques épigénétiques, et donc l'expression de nos gènes, est modulée par l'environnement cellulaire ou physiologique. Les gènes et les cellules sont particulièrement sensibles aux modifications environnementales au cours du développement embryonnaire et dans les premiers mois de la vie. La sensibilité de l'épigénome à l'environnement semble persister tout au long de l'existence mais diminue probablement progressivement avec le ralentissement de la croissance (Gluckman PD et al, 2009).

Les deux mécanismes épigénétiques majeurs sont la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (par phosphorylation, acétylation, méthylation) sur les cytosines des séquences de nucléotides cytosine phosphate guanine (dinucléotide CpG, appelés aussi îlots CpG). Ils se situent dans les régions promotrices du gène et modulent l'expression génique en bloquant le facteur de transcription de l'ADN (*Figure 6*). La méthylation a lieu très tôt dans la grossesse. Des événements environnementaux peuvent induire des méthylatons de l'ADN permanentes avec un impact sur l'âge adulte de la descendance exposée pendant la grossesse.

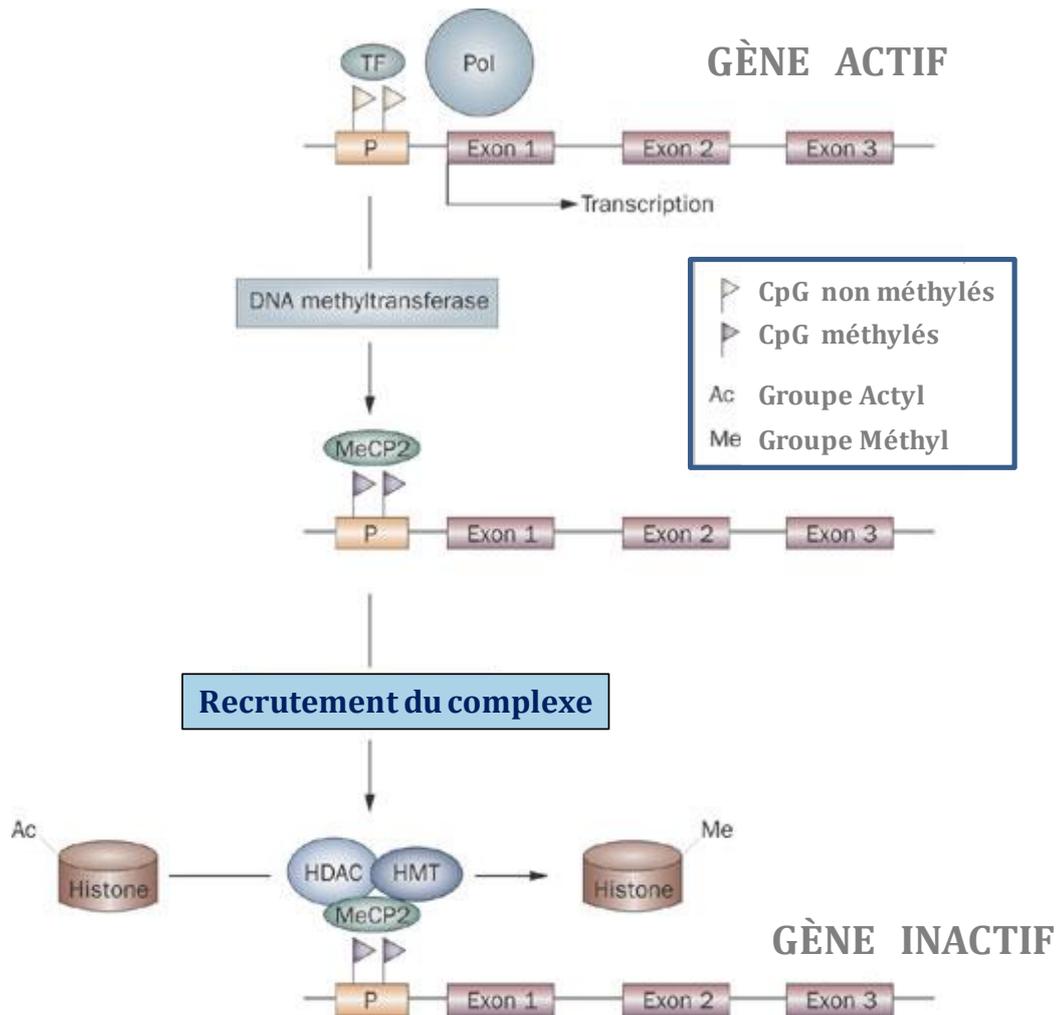


Figure 6 Modulation épigénétique de l'expression génique, d'après Gluckman PD et al, 2009.

Les CpG du gène actif sont méthylés sous l'action de la DNA méthyltransférase, puis se lie à la MeCP2 avec recrutement des HDAC et HMT pour acétyler ou méthylé les histones pour inactiver le gène; HDAC: histone déacétylase; HMT: histone méthyl-transférase; MeCP2: méthyl-CpG binding protein2; P: promoteur; Pol: RNA polymérase; TF: facteur de transcription

Un exemple de modifications épigénétiques possibles dans le cadre du diabète maternel est la modification de l'expression du gène *Pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1)* dans un modèle de rate diabétique avec diabète induit par la streptozotocine, détruisant les cellules bêta en 24 heures. Les rats issus de ces rates présentaient un RCIU à la naissance. Pdx1 est un facteur de transcription nécessaire pour le développement des cellules β du pancréas et la

production d'insuline. L'expression de *Pdx1* était réduite dans les cellules β et les rats développaient un diabète de type 2 à l'âge adulte. La réduction de la transcription de *Pdx1* a été médiée par une cascade de modifications épigénétiques aboutissant à la mise sous silence de *Pdx1* après diminution de l'acétylation des histones au niveau du promoteur proximal de *Pdx1* (Park JH et al, 2008) (*Figure 7*).

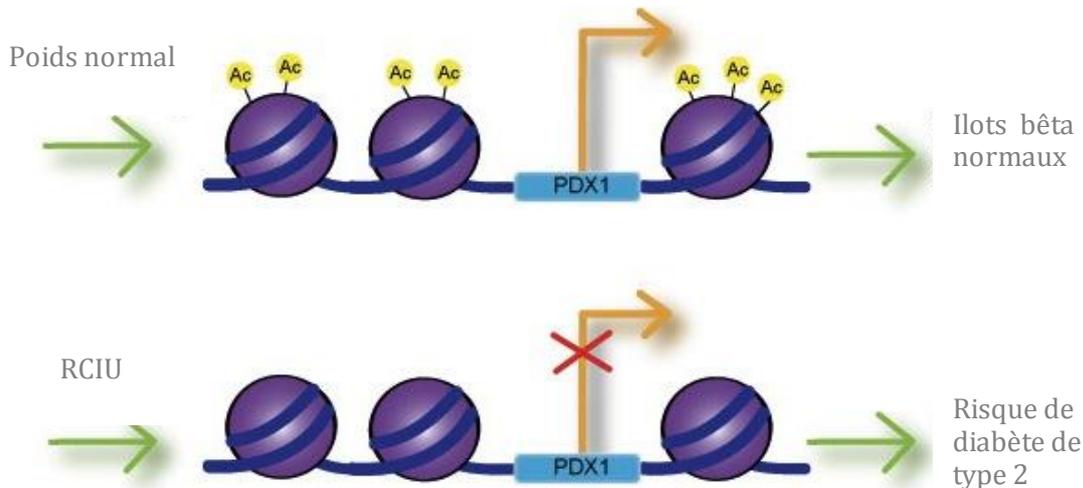


Figure 7 Modifications épigénétiques aboutissant à la mise sous silence de *Pdx1* en cas de RCIU à la naissance après exposition à un diabète maternel *in utero* à travers une diminution de l'acétylation (ac) des histones, d'après Park JH et al, 2008

D'autres études ont mis en évidence une hypométhylation de l'ADN dans le foie de rats Sprague-Dawley traités par la streptozotocine et rendus diabétiques. Cette hypométhylation n'était pas retrouvée dans le rein, suggérant des mécanismes épigénétiques tissu spécifiques (Williams KT et al, 2008). Il y a quelques données humaines suggérant que la méthylation de l'ADN pourrait être impliquée dans les changements d'expression de gènes dans le diabète maternel. C'est le cas du coactivateur de transcription du peroxisome proliferator activated gamma receptor PPARGCA-1, régulateur de gènes mitochondriaux dont l'expression est réduite de 90% dans les îlots pancréatiques de patients diabétiques de type 2 comparés à des îlots contrôles. Le promoteur du gène PPARGCA-1 des îlots diabétiques avait une augmentation de la méthylation de l'ADN, deux fois supérieure au contrôle laissant suggérer une influence épigénétique du diabète (Ling C et al, 2008).

Je vous propose pour clore ce chapitre, la *Figure 8* qui reprend de façon schématique l'ensemble des mécanismes que nous venons de voir.

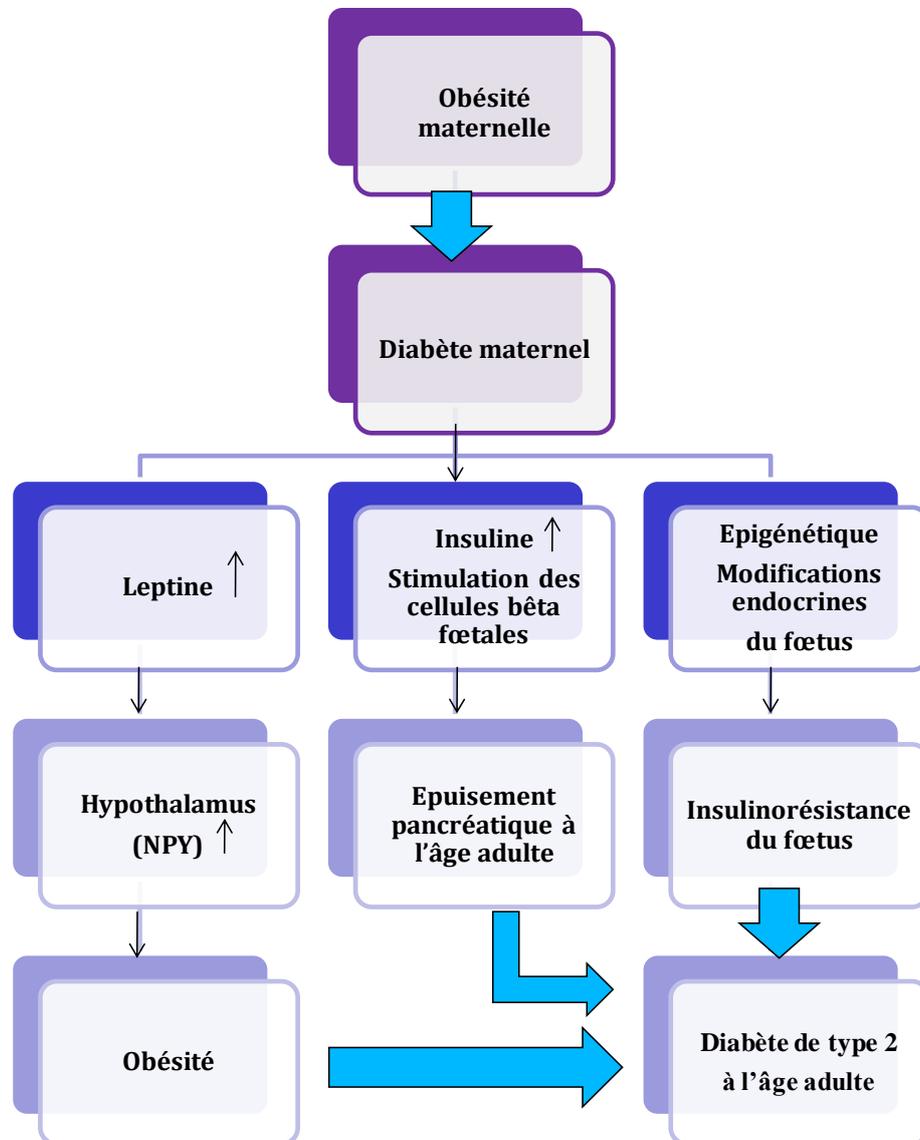


Figure 8 Potentiels mécanismes des liens entre le diabète maternel et le syndrome métabolique de la descendance. En mauve, la mère et en bleu la descendance

POINTS-CLÉS

- Certaines expositions, notamment nutritionnelles, dans la période fœtale et post natale semblent être des déterminants de la santé ultérieure.
- L'hypothèse de Barker implique l'environnement nutritionnel intra-utérin mais aussi postnatal aboutissant à une programmation de certaines fonctions par des modifications morphologiques ou fonctionnelles liées à des mécanismes épigénétiques.
- Les modifications de l'environnement materno-fœtal peuvent aussi bien résulter d'une sous-nutrition mais aussi conséquence d'un diabète maternel, d'une obésité maternelle.
- Durant le développement, les hormones jouent un rôle crucial dans la détermination des seuils de l'homéostasie des systèmes neuro-endocrines qui régulent les fonctions clés de l'organisme.
- La modification des taux circulants de certaines hormones comme l'insuline ou la leptine chez le fœtus *in utero* a pour conséquence des altérations morphologiques et/ou fonctionnelles au niveau central ou périphérique.
- Ces altérations pourraient être en partie expliquées par des modifications épigénétiques.

VERS LE CHAPITRE III, IV, V.....

La régulation de la croissance fœtale est un mécanisme complexe et fait intervenir des facteurs génétiques, nutritionnels maternels, circulatoires et fœtaux (insuline, hormone lactogène placentaire, GH, hormones thyroïdiennes, glucocorticoïdes, autres facteurs de croissance...). La croissance fœtale est proportionnelle à la croissance placentaire et le défaut de croissance placentaire en fin de grossesse constitue un facteur limitant. Le placenta a été longtemps considéré comme un organe inerte, un simple filtre. Actuellement, de nombreux travaux montrent que le placenta est un véritable organe complexe et invasif, avec des fonctions endocrines et paracrines. Malgré le rôle essentiel joué par cet organe au cours du développement fœtal, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui président à son développement restent à ce jour insuffisamment connus.

Le placenta, organe transitoire et autonome, joue un rôle clé dans la croissance fœtale à travers ses fonctions multiples. C'est un organe nourricier, métabolique, endocrine; il s'adapte continuellement à l'environnement maternel et fœtal. La notion de "cross-talk" placentaire est maintenant reconnue. Il s'agit d'un dialogue croisé entre la mère, le fœtus et le placenta. Le placenta est au centre de ce dialogue à travers ses flux sanguins (*Figure 9*).

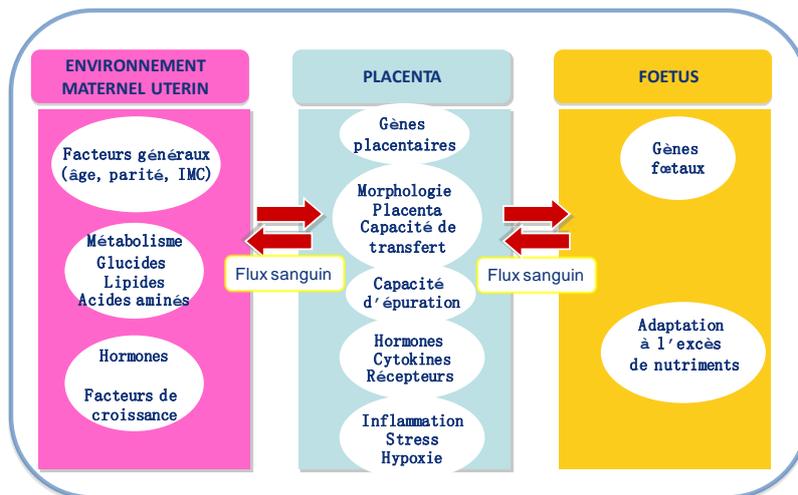


Figure 9 "Cross-talk placentaire". Echanges entre l'environnement maternel et l'unité fœtale à travers la barrière placentaire

Nous poserons d'abord les bases de la placentation physiologique chez l'Homme et le rongeur dans le [chapitre III](#).

Nous décrirons dans un deuxième temps l'hormonologie placentaire physiologique de la grossesse en la comparant entre ces deux espèces dans le [chapitre IV](#).

Enfin, nous reprendrons, dans le [chapitre V](#) en détail les données de la littérature évaluant l'impact du diabète maternel sur l'unité foeto-placentaire, avec une perspective plus fondamentale, à la fois à partir des données humaines mais également des données obtenues à partir des modèles animaux.

CHAPITRE III

BASES DE LA PLACENTATION CHEZ L'HOMME ET LES MURINS

STRUCTURE ET DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA CHEZ L'HOMME

I- STRUCTURE DU PLACENTA À TERME

Chez l'homme, le placenta est hémomonochorial, villositaire, les villosités placentaires fœtales pénètrent jusque dans les vaisseaux sanguins maternels et sont directement en contact avec le sang maternel (*Figure 10*).

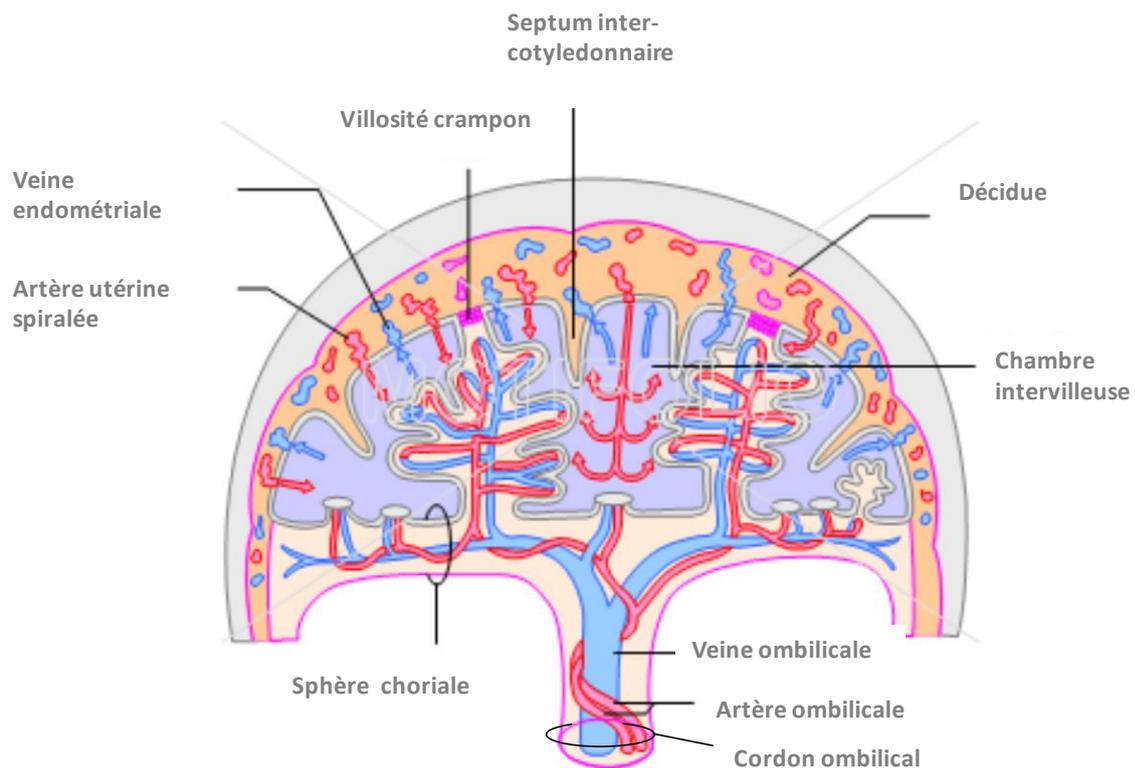


Figure 10 Représentation d'une coupe sagittale structure fœto-placentaire à terme chez l'Homme

Une couche de syncytiotrophoblaste le sépare du sang maternel (*Figure 11*) qui forme la barrière foeto-placentaire. L'aboutissement à cette structure à terme sera détaillée ci-dessous.

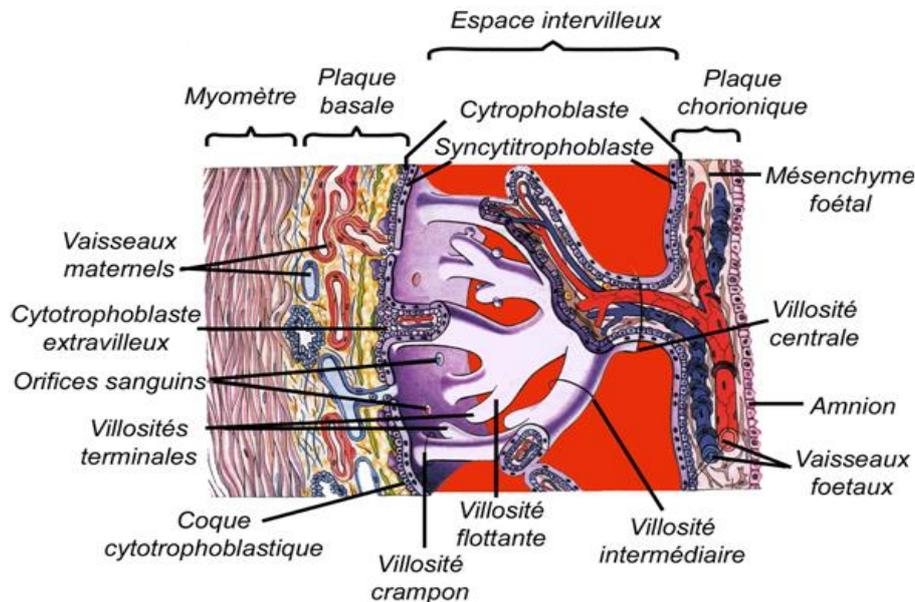


Figure 11 Représentation de la barrière placentaire

À terme, le placenta humain mesure environ 20 cm de diamètre, 3 cm d'épaisseur et pèse environ 500 g. L'ensemble des villosités représente une surface de 10 à 14 m² et contient un réseau sanguin capillaire de 50 km.

II- DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA DURANT LA GROSSESSE

A- LE DÉVELOPPEMENT PRÉCOCE DU PLACENTA

Le développement du placenta précoce compte trois stades : prélacunaire, lacunaire et vilieux (*Figure 12*) d'après Alsat A et al 1999

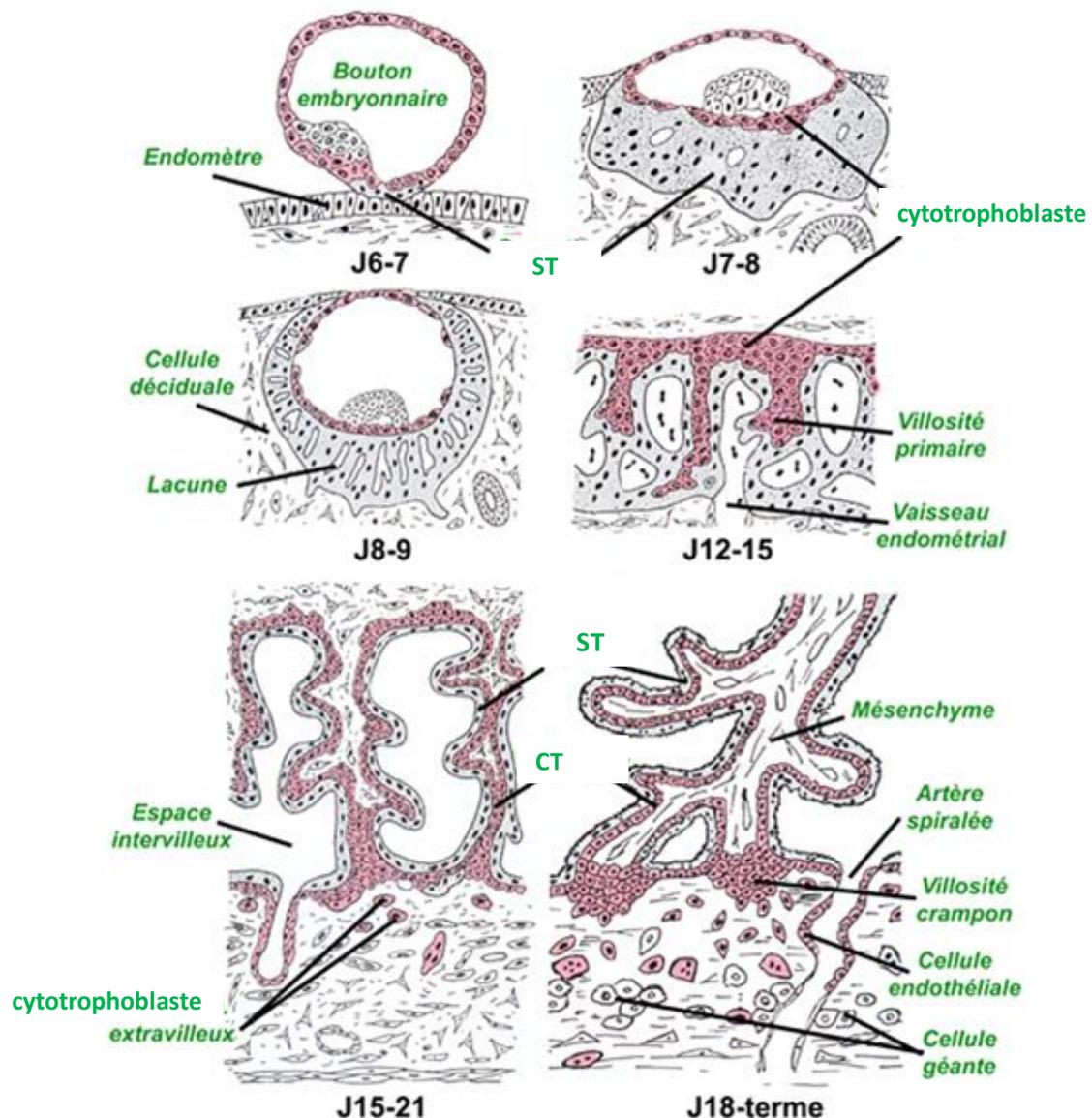


Figure12 Etapes du développement du placenta humain, d'après Alsat A et al, 1999

- ❖ **Le stade prélacunaire** se définit du 6^{ème} jusqu'au 8^{ème} jour après la fécondation où le blastocyste s'ancre à l'endomètre maternel, c'est l'apposition. Le trophoctoderme (ou trophoblaste) se différencie alors en 2 couches: le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste au point d'ancrage, c'est l'adhésion. Le syncytiotrophoblaste va permettre par son activité protéolytique intense au blastocyste de pénétrer l'épithélium utérin, c'est l'implantation ou nidation

- ❖ *Le stade lacunaire* se définit du 8^{ème} au 12^{ème} jour avec l'apparition de larges vacuoles dans la masse syncytiale. Dans l'endomètre, les cellules du chorion deviennent volumineuses et arrondies dans la zone d'implantation autour des artérioles spiralées, elles deviennent des cellules décidualisées.
- ❖ *Le stade vilieux* où à partir du 12^{ème} jour, les cellules trophoblastiques envahissent le syncytium pour donner naissance aux villosités choriales primaires.
A partir du 15^{ème} jour, des cellules mésenchymateuses envahissent les villosités primaires pour former les villosités secondaires. Parallèlement les vacuoles du syncytiotrophoblaste fusionnent et donnent naissance à la chambre intervillieuse.
La structure tertiaire et définitive de la villosité apparaissant au 21^{ème} jour est définie par l'apparition des capillaires fœtaux dans l'axe mésenchymateux.

B- LE TROPHOBLASTE VILLEUX

Après la nidation, le trophoblaste se différencie selon 2 voies: le trophoblaste vilieux et le trophoblaste extravillieux. Le trophoblaste vilieux sera le tissu d'échange fœto-maternel et endocrine. L'extra-villieux sera impliqué dans le remodelage des artères spiralées.

L'unité fonctionnelle du placenta humain est la villosité chorale qui adopte sa structure définitive au 21^{ème} jour de grossesse (*Figure 13*). Elle est composée d'un axe mésenchymateux peuplé de cellules de Hofbauer et de fibroblastes et est bordé par le trophoblaste composé d'une couche externe de cellules syncytiotrophoblastiques et d'une couche interne de cellules cytotrophoblastiques. Elle est soit ancrée dans l'endomètre maternel et appelée alors villosité crampon, soit flottante dans l'espace intervillieux et appelée villosité flottante.

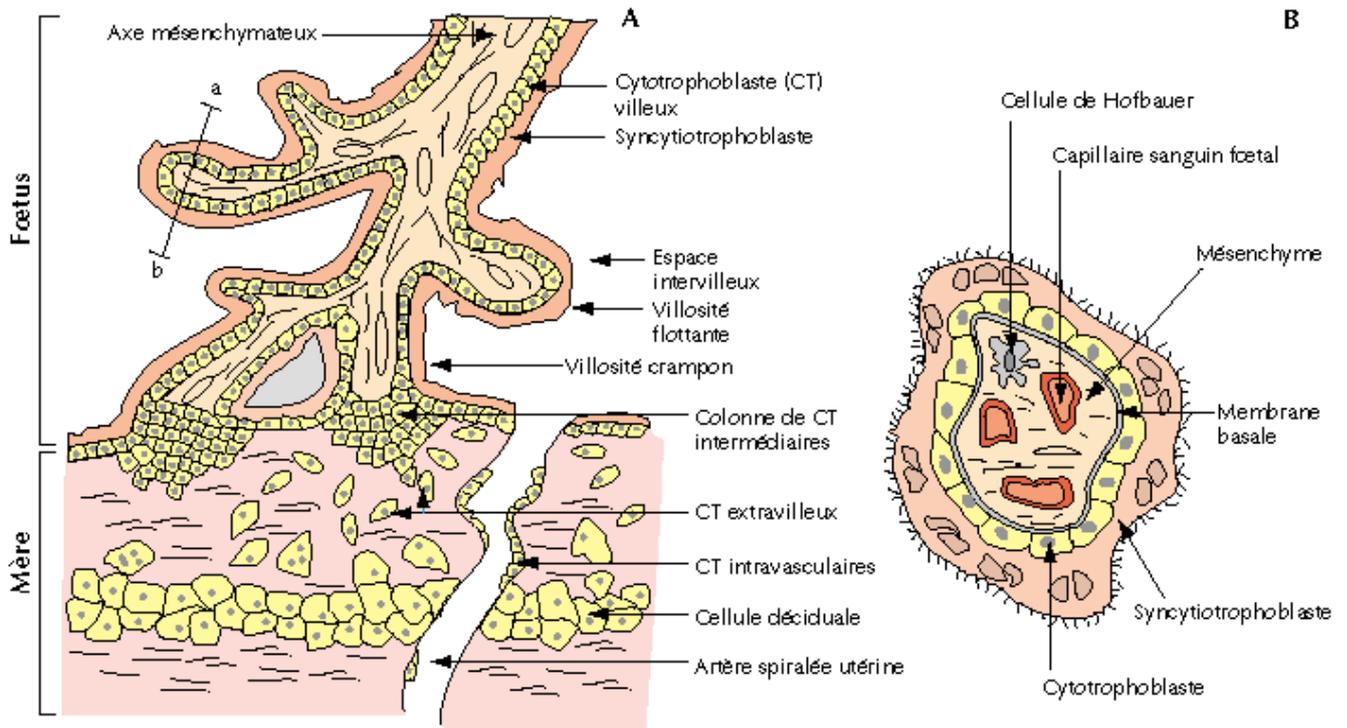


Figure 13 Villosité choriale d'après Alsat A et al, 1999
A : Villosité choriale et B: coupe transversale d'une villosité
 CT: cytotrophoblaste

A partir de la 4^{ème} semaine, les villosités se sont développées dans tous les sens et forment la sphère choriale. Les villosités tertiaires, appelées aussi primordiales (1er ordre) s'arborescent pour donner naissance à des ramifications de 2^{ème} ordre (les villosités préterminales) et de 3^{ème} ordre (les villosités terminales). Chaque arborescence correspond à une unité fonctionnelle vasculaire appelé cotylédon et le cordon ombilical se met en place avec deux artères et une veine.

A partir du 4^{ème} mois, au sein de la villosité choriale, le cytotrophoblaste se réduit de plus en plus jusqu'à ce qu'il ne persiste que quelques amas sous le syncytiotrophoblaste à terme. Les capillaires fœtaux se multiplient et se rapprochent de la surface de la villosité, les noyaux du syncytiotrophoblaste se regroupent en zones nucléés (zone de synthèse) et en zones anucléés (zone d'échange). La coque trophoblastique se transformera en tissu conjonctif pour constituer les septas intercotylédonnaires.

C- LE TROPHOBLASTE EXTRA-VILLEUX (TEV)

On appelle cytotrophoblaste extravilleux (CEV), le cytotrophoblaste qui se situe à l'extérieur de la villosité. Les cellules du cytotrophoblaste à la base de la villosité crampon se différencient, perdent leur polarité et acquièrent un phénotype prolifératif en colonnes, ce sont les cytotrophoblastes intermédiaires qui peuvent alors percer le syncytiotrophoblaste, le déborder et former la coque trophoblastique (Tstatsaris Vet al, 2006).

De cette coque trophoblastique, certains trophoblastes se détachent, perdent leur caractère prolifératif, se différencient en cytotrophoblastes invasifs sous l'effet notamment de métalloprotéases, d'intégrines (*Figure 15*).

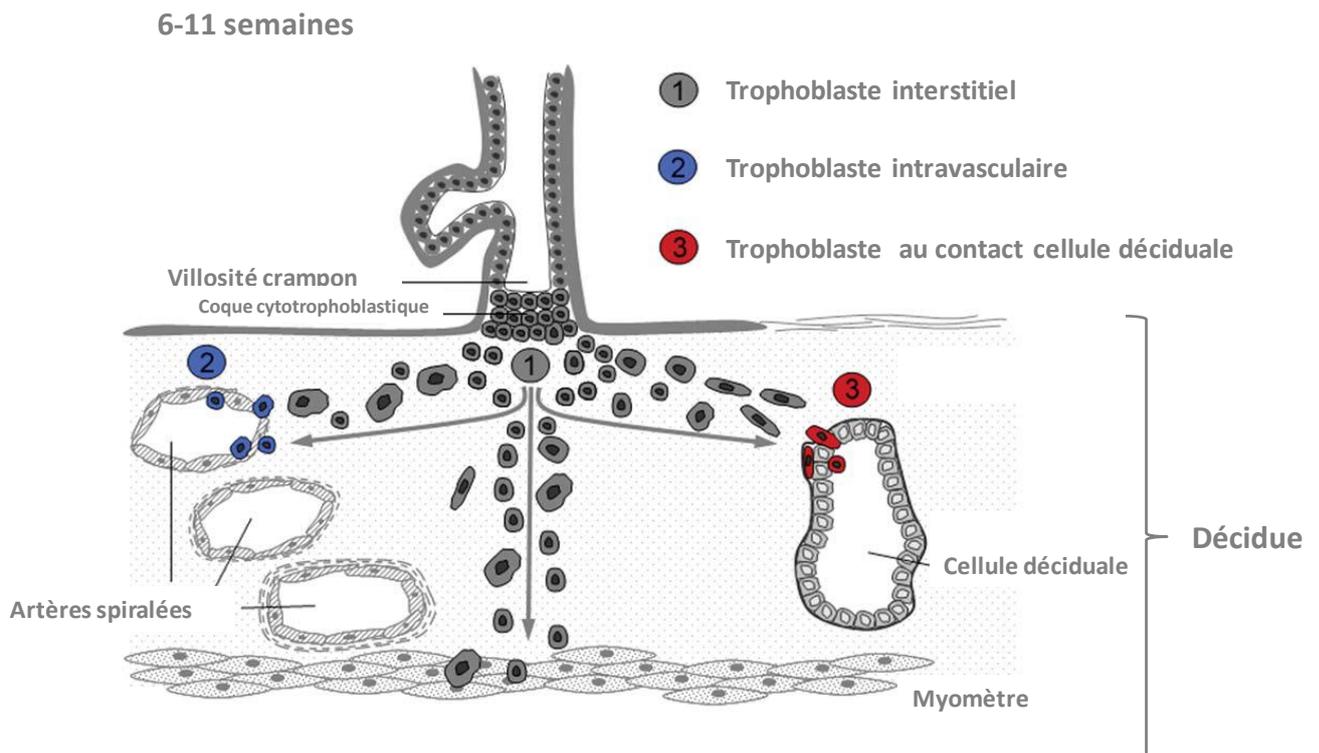


Figure 14 Migration des cytotrophoblastes invasifs du TEV, d'après Moser et al, Human reproduction, 2010

Ils peuvent migrer dans l'endomètre utérin à l'aide de l'interaction des cellules déciduales et se différencier en cellules géantes binuclées ou trinuclées. D'autres migrent de façon plus spécifique vers la paroi des artères utérines où elles se différencient et deviennent endovasculaires, ce sont les cytotrophoblastes intravasculaires qui se différencieront par la suite en cellules endothéliales (*Figure 15*) (Kaufmann P et al et al, 2003; Tsatsaris V et al, 2006). Ces phénomènes de prolifération et d'invasion peuvent avoir des caractéristiques communes avec les cellules malignes (Fischer SJ et al, 1993).

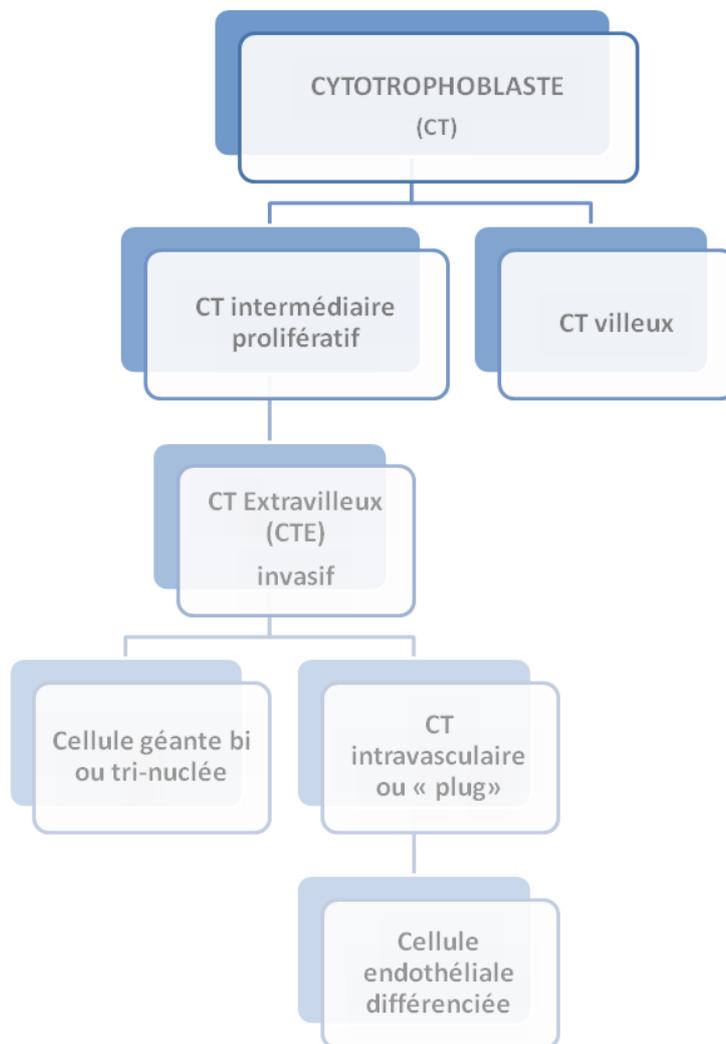


Figure 15 Etapes de différenciation du cytotrophoblaste, d'après Tsatsaris V et al, 2006

D- LA DÉCIDUE

Elle est le partenaire du cytotrophoblaste notamment par l'expression de l'IGFBP1 qui commande la migration du celui-ci. En l'absence de l'épithélium utérin, certains auteurs ont démontré que l'invasion trophoblastique était insuffisante (Moser G et al, 2010).

La muqueuse utérine maternelle est modifiée au siège de l'implantation par la réaction déciduale (transformation de type épithélial des fibroblastes du stroma endométrial par accumulation de lipides et de glycogène) et prend le nom de caduque ou décidue. Les cellules stromales se différencient et deviennent des cellules déciduales, plus larges et polygonales (Salamosen LA et al, 2003). Elle est sous l'influence de certaines hormones comme l'œstradiol, la progestérone, l'hormone chorionique gonadotrope (HCG) mais aussi de l'environnement immunitaire (Remes Lenicov F et al, 2012; Robertson SA, 2005). Il se produit une hypervascularisation locale avec des artères qui deviennent spiralées.

La muqueuse utérine est siège d'une infiltration lymphoïde (macrophages, cellules Natural Killer (NK)) (Hess AP et al, 2006). Ces cellules NK jouent un rôle crucial car leur dysrégulation entraîne un échec d'implantation, une intolérance immunitaire de la grossesse. Leur recrutement est notamment sous la dépendance de la prolactine sécrétée par les cellules déciduales (Carlino C et al, 2008). Les cellules stromales décidualisées produisent un grand nombre de facteurs de croissance (Endothelial Growth Factor (EGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), IGFBP1) (Hess AP et al, 2006), des hormones comme la prolactine (PRL) (Jabbour HN et al, 2001).

III- ANGIOGÉNÈSE PLACENTAIRE ET INVASION TROPHOBLASTIQUE

Au tout début de la grossesse, l'embryon ne se nourrit que par simple diffusion, ses besoins s'accroissant de plus en plus et la mise en place d'une circulation materno-fœtale lui est indispensable pour assurer sa survie (*Figure 16*).

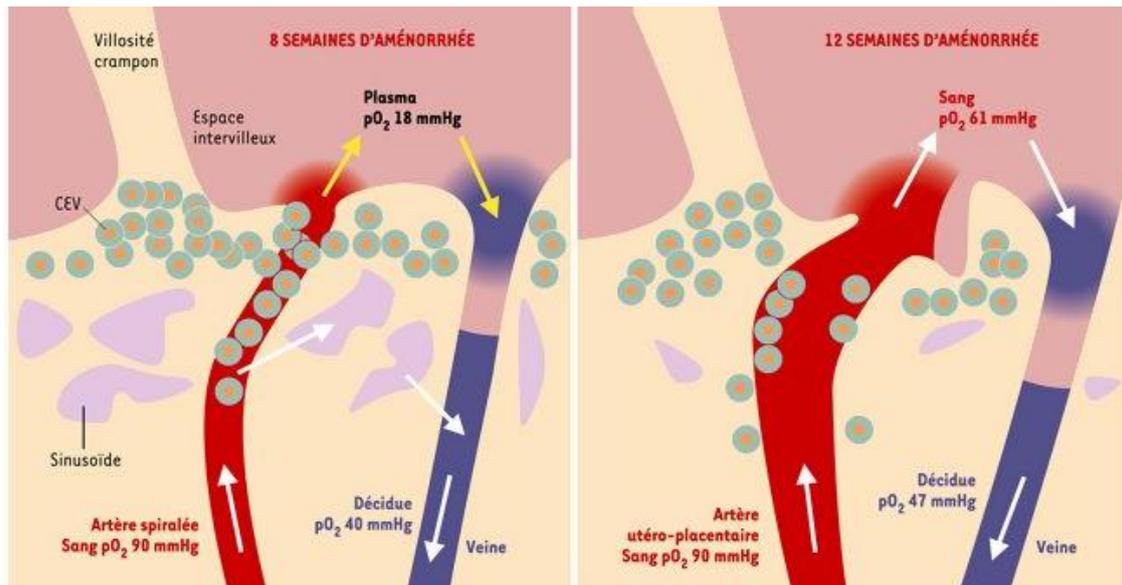


Figure 16 Circulation intervillieuse au premier trimestre, (Challier JC et al, 2003)

Tout d'abord du côté maternel, du fait de la réaction déciduale, les artères sont remodelées et se spiralisent. Par la suite, de la coque trophoblastique au pôle apical de la villosité, certains trophoblastes peuvent migrer vers la paroi des artères utérines qu'ils érodent et qui devient plus atone où elles se différencient pour donner naissance aux cytotrophoblastes intravasculaires. La mise en place de ce nouvel endothélium permet une forte diminution des résistances vasculaires qui a pour conséquence une augmentation du débit sanguin utéroplacentaire (Challier JC et al, 2013).

Ces cytotrophoblastes obstruent alors la lumière artérielle et forment des bouchons ou "plugs" cytotrophoblastiques. Il se crée alors un environnement hypoxique transitoire avec une pression artérielle en oxygène basse à 3 mm Hg sans passage d'éléments figurés du sang dans la chambre villeuse jusqu'à la 10^{ème} semaine de grossesse (Burton GJ et al, 2009; Challier JC et al, 2013). Ces plugs peuvent aussi avoir pour origine les cytotrophoblastes interstitiels qui envahissent la paroi artérielle pour certains auteurs ou une combinaison des deux origines, ceci est actuellement débattu.

Cet environnement hypoxique transitoire jusqu'à la 10^{ème} semaine de grossesse est indispensable à cette étape du développement pour empêcher la formation de radicaux libres, et favoriser l'angiogénèse et le mécanisme plutôt anaérobie des divisions cellulaires

trophoblastiques (Mondon F et al. 2005). Les échanges d'oxygène à cette étape à travers la barrière placentaire jouent un rôle clé.

Les "plugs trophoblastiques" sont alors dissous ce qui permet l'entrée progressive du sang maternel artériel dans la chambre intervillieuse et l'augmentation de la pression artérielle en oxygène pour permettre la mise en place de la circulation materno-fœtale. Les cytotrophoblastes intravasculaires se différencient alors en authentiques cellules endothéliales.

Il est important de noter que les artères utérines spiralées se remodelent bien avant l'invasion trophoblastique par une vacuolisation endothéliale et une désorganisation des cellules musculaires lisses de la paroi utérine dues notamment à une activation du système rénine-angiotensine décidual (*Figure 17*).

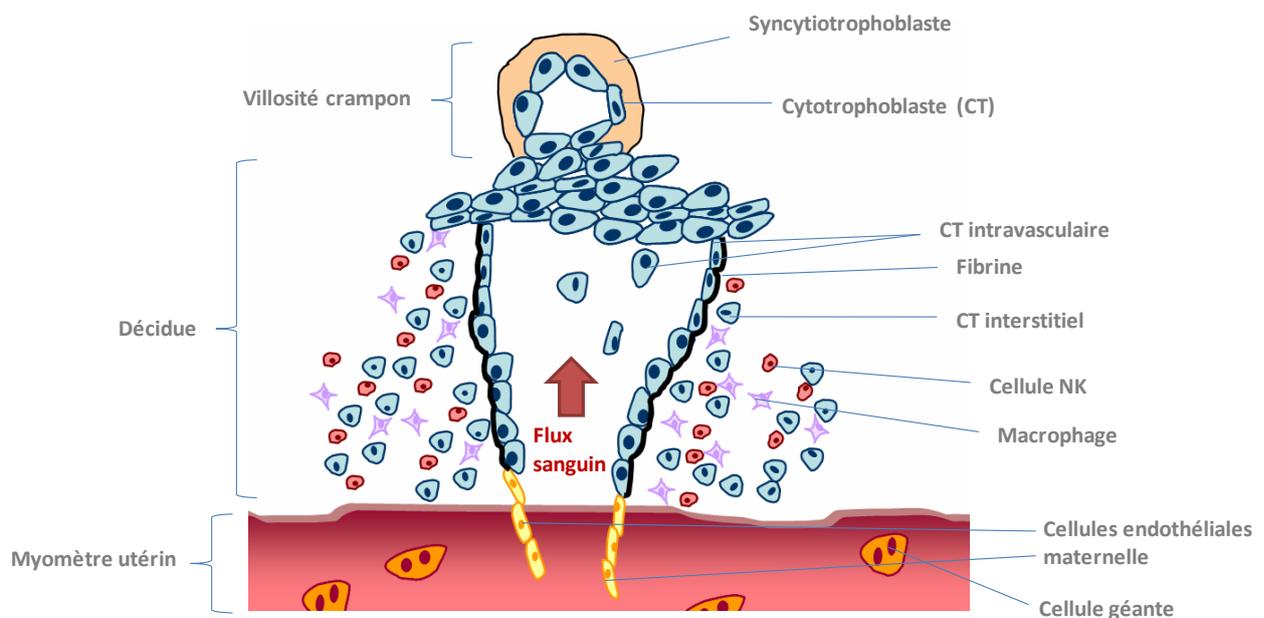


Figure 17 Spiralisation des artères utérines sous l'action des cytotrophoblastes extra-villeux, d'après Lunghi L et al, 2007

Ces artères traversent le myomètre avant de se transformer en artères spiralées au niveau de l'endomètre avec dilatation de la portion terminale de ces vaisseaux. De nombreux facteurs angiogéniques régulent cette étape comme le Nitric oxyde (NO), le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A.

Du côté fœtal, au sein de la villosité secondaire, vers le 17^{ème} jour, les angioblastes se différencient en îlots vasculo-sanguins primitifs, sous l'effet du VEGF via les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, de l'angiopoïétine, du Placental Growth Factor (PGF) (Demir R et al, 2005; Kaufmann P et al, 2004; Zhou Y et al, 2003). Les premiers signes de vasculogénèse apparaissent au 21^{ème} jour, une fois la villosité tertiaire formée. Les capillaires fœtaux se multiplient et se rapprochent de la surface de la villosité avec formation d'une unité vasculaire. Les circulations fœtale et maternelle s'échangent à travers une circulation allanto-choriale.

STRUCTURE ET DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA CHEZ LE RONGEUR

Le rongeur est le modèle le plus utilisé dans l'étude du développement du placenta du fait de ses similitudes d'architecture et de mécanismes moléculaires avec celui de l'homme.

I- STRUCTURE DU PLACENTA

Chez le rat, le placenta est divisé en plusieurs zones bien distinctes (*Figure 18*).

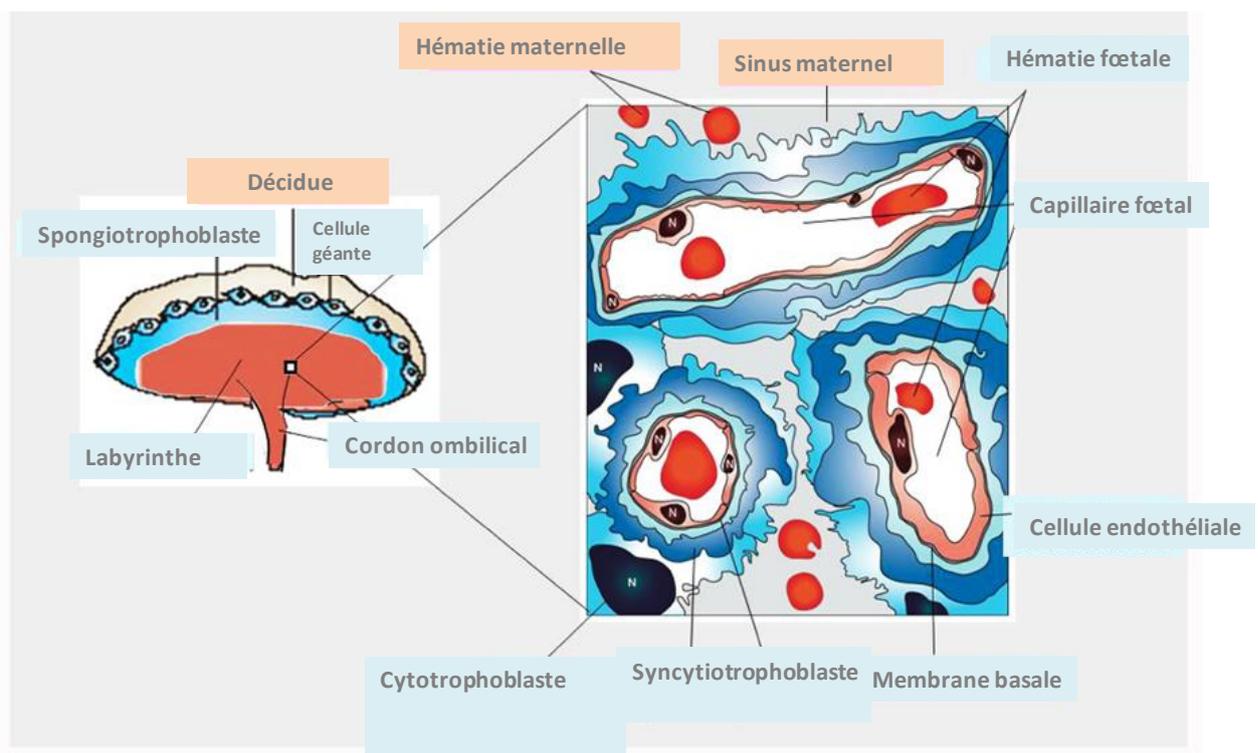


Figure 18 Coupe embryonnaire d'un placenta à terme avec agrandissement de la zone labyrinthique, d'après Tomoko KI et al, 2012

On distingue:

❖ *La déciduale (ou décidue)*

Elle contient les leucocytes maternels. Les cellules endométriales sont alors transformées en cellules stromales déciduales. La déciduale contient les artérioles spiralées qui acheminent au placenta le sang maternel.

❖ *Le spongiotrophoblaste (ou zone de jonction)*

Il est composé de larges cellules trophoblastiques et de cellules à glycogène. La zone jonctionnelle est impliquée dans les fonctions endocrines et invasives du placenta et est vascularisée par le sang maternel.

❖ *La zone labyrinthique (ou labyrinthe)*

Le labyrinthe est la zone d'échange de nutriments et de gaz entre les capillaires fœtaux et les vaisseaux maternels. La *zone labyrinthique* forme donc une barrière majeure dans le contrôle du transfert des nutriments. Trois couches de trophoblastes composent la zone labyrinthique, d'où la classification de placenta hémotrichorial :

- ❖ 1 couche à l'interface maternelle (ou cytotrophoblaste), cellulaire, avec présence de microvillosités à la surface.
- ❖ 2 couches de cellules (ou syncytiotrophoblaste) dont les fonctions principales sont la régulation du transfert de nutriments et les échanges au travers du placenta.

II- DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA DURANT LA GESTATION

Le développement du placenta (*Figure 19*) débute par le blastocèle qui devient, au 3.5^{ème} jour embryonnaire (E3.5) chez la souris et à E4.5 chez le rat, un blastocyste avec une masse cellulaire interne qui donnera lieu au futur embryon et une couche externe, le trophoctoderme.

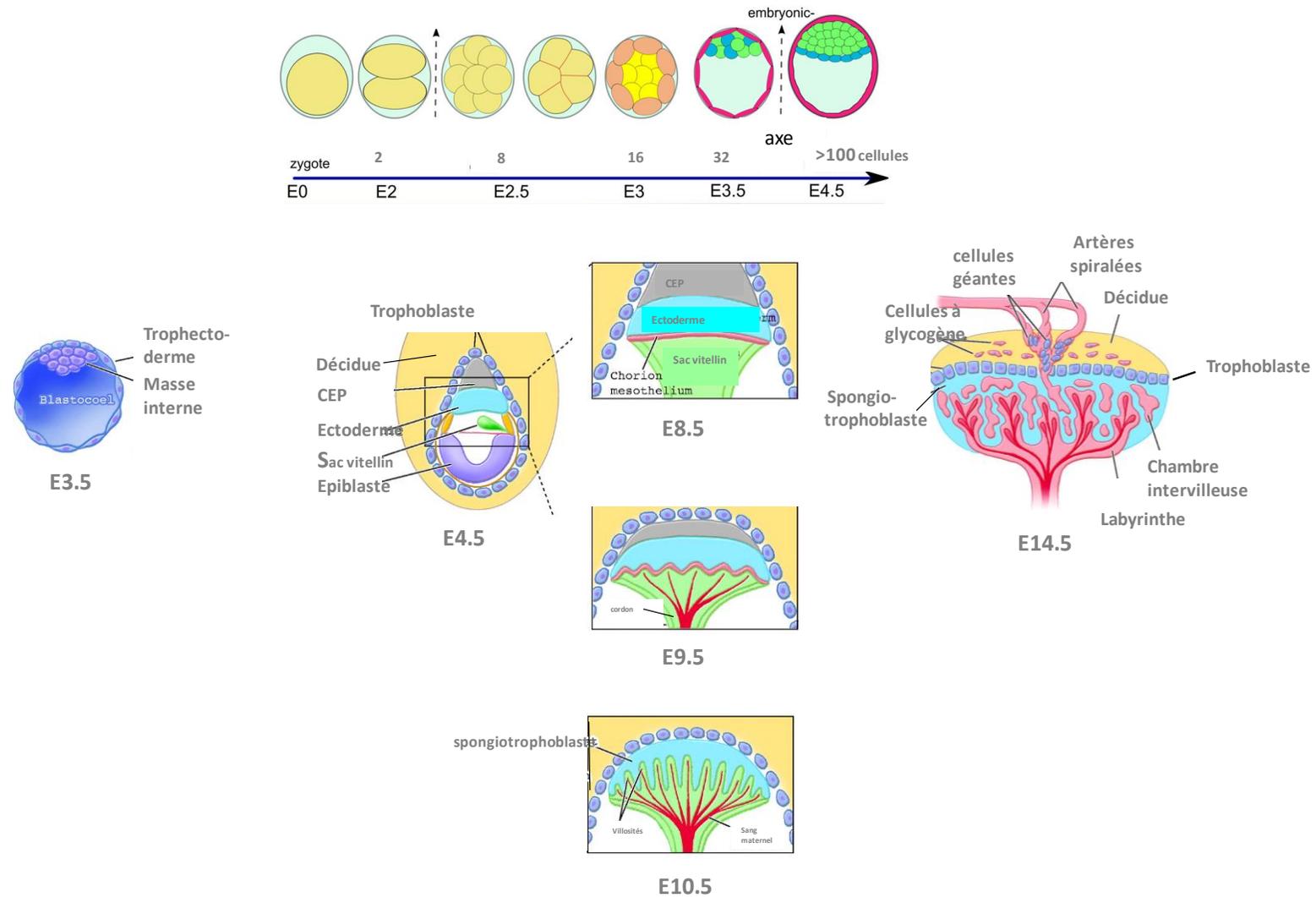


Figure 19 Développement du placenta murin (souris), d'après Krupinski P et al, 2011; Watson CS et al, 2005
 E0 à E14.5 avec à E14.5 le placenta mature avec ses 3 couches. CEP=cône ectoplacentaire

Le trophoctoderme au contact de la masse cellulaire interne est dit "mural" et celui en contact avec la masse cellulaire interne est dit polarisé. Le blastocyste subit une maturation, la masse cellulaire interne se différencie en endoderme et ectoderme primitifs (Cross JC et al, 1994).

À E4.5 chez la souris (E5.5 chez le rat), le blastocyste s'implante dans la muqueuse utérine avec la formation de la déciduale qui est une structure stromale dérivée de l'endomètre utérin. L'implantation se déroule en 3 phases: l'apposition, l'adhésion et la pénétration (Rossant J et al, 2001). Pendant la phase d'apposition, le trophoctoderme mural rentre en contact avec la muqueuse utérine qui se décidualise puis y adhère, c'est la phase d'adhésion. Il s'en suit une phase de pénétration, où le blastocyste pénètre la muqueuse utérine grâce à une décidualisation de plus en plus forte. Le trophoctoderme mural se différencie alors en trophoblaste avec des cellules géantes qui ne se divisent plus mais qui continuent à répliquer leur ADN (endoréplication) et sont polyploïdes.

Quant au trophoctoderme polarisé, ses cellules vont proliférer et migrer dans plusieurs directions. Elles migrent autour de l'embryon jusqu'à l'entourer et le pousser vers le centre du blastocyste, vers la muqueuse utérine. Ces cellules sont également polyploïdes. Ce trophoctoderme polarisé se différencie alors en deux types cellulaires: l'ectoderme extra-embryonnaire et le cône ectoplacentaire. La nature invasive de ces cellules semble en relation avec une augmentation de synthèse de métalloprotéases (MMPs) et de leurs inhibiteurs (Borbely AU et al, 2014).

L'ectoderme extra-embryonnaire se différenciera en trophoblaste chorionique qui donnera naissance au labyrinthe et le cône ectoplacentaire deviendra le spongiotrophoblaste (ou zone de jonction). Le spongiotrophoblaste a surtout un rôle structural (de soutien pour le labyrinthe) et endocrine. Le nombre de cellules spongiotrophoblastiques se multiplie surtout entre E12,5 et E16,5 chez la souris (E14 à E17.5 chez le rat) pour diminuer progressivement jusqu'au terme (Watson ED et al, 2005).

Entre E6.5 et E7.5 chez la souris (E8 à E8.5 chez le rat), le cône placentaire donnera naissance à des cellules à glycogène, des spongiotrophoblastes, des cellules géantes trophoblastiques. Ces types cellulaires seront alors retrouvés dans la zone de jonction. Ces cellules géantes trophoblastiques (CGT) peuvent se retrouver au niveau des parois des artères utérines spiralées et devenir intravasculaires. Les cellules à glycogène accumulent le glycogène

et sont détectables chez la souris dès E10.5 (e12 chez le rat) et peuvent migrer dans la décidue à partir de E12.5 (E14 chez le rat) qui coïncide avec une dilatation des artères spiralées. Entre E12.5 et E16.5 chez la souris (E14 à E17.5 chez le rat), elles prolifèrent et se retrouvent surtout dans le spongiotrophoblaste ou zone de jonction. En fin de gestation, des cellules trophoblastiques à glycogène se différencient dans le spongiotrophoblaste pour migrer par la suite dans le mur utérin (Adamson SL et al, 2002). Le rôle de ces cellules reste à définir. Une des hypothèses serait la libération du glucose dans le sang maternel qui irrigue le labyrinthe à la fin de la gestation, permettant ainsi d'assurer les besoins fœtaux durant cette période de forte croissance (Coan PM et al, 2006).

L'endoderme primitif mis en place à E3.5 chez la souris, va former l'allantoïde à partir de l'endoderme extra-embryonnaire à E8.0 (E9.0 chez le rat). L'allantoïde va s'accoler au trophoblaste par un processus d'attachement à E8.5 chez la souris (E9 chez le rat) pour former un placenta chorio-allantoïdien (Saunders DN et al, 2004). C'est aussi la première étape du développement du labyrinthe. L'attachement chorio-allantoïde est cruciale, son défaut est responsable de certaines causes létales embryonnaires (Giroux S et al, 1999).

A E8.5 chez la souris (E9.0 chez le rat), le trophoblaste chorionique se différencie en deux types cellulaires qui composeront le labyrinthe:

- ❖ les cellules du syncytiotrophoblaste multinuclées, nées d'une fusion de cellules trophoblastiques et entourant les capillaires fœtaux, elles forment deux couches de cellules.
- ❖ les cellules du trophoblaste, mononuclées formant une seule couche de cellules, en contact avec le sang maternel.

A E9.5 chez la souris (E11 chez le rat), il se forme des villosités dans lesquels vont se former les vaisseaux allantoïdiens. Ensemble, les cellules trophoblastiques et les vaisseaux fœtaux formeront dès E10.5 (E12.0 chez le rat) des villosités qui deviennent de plus en plus larges jusqu'au terme (Watson ED et al, 2005).

III- ANGIOGÉNÈSE PLACENTAIRE ET INVASION TROPHOBLASTIQUE

Les cellules utérines NK régulent en partie la vasodilatation des artères utérines au site d'implantation du blastocyste pour augmenter le flux sanguin maternel. Bien que les cellules du trophoblaste invasif murin partagent des mécanismes analogues à l'humain, le remodelage des artères utérines est indépendant de l'invasion des cellules du trophoblaste. Le rôle de ces cellules est plutôt indirect que direct, agissant plutôt comme facteur de perméabilité vasculaire. Il y a deux types d'invasions: péri/endovasculaire et interstitielle.

Le sang maternel arrive au niveau de l'utérus par des artères radiales qui s'arborescent pour former les artères spiralées au niveau d'un triangle métrial peuplé de cellules NK et de cellules déciduales. Les artères spiralées se dilatent et leur paroi perd en élastine et en cellules musculaires lisses sous l'influence des cellules NK. Puis, elles convergent vers les CGTS qui vont peupler alors les parois des artères utérines en se différenciant en cellules endothéliales qui remplaceront progressivement l'endothélium initial.

Le sang maternel est alors déversé dans des sortes de canaux que délimitent les CGT. Ces canaux traversent le spongiotrophoblaste et conduisent le sang maternel jusqu'au labyrinthe. Il se produit une circulation à contre courant (*Figure 20*). Le sang fœtal traverse le labyrinthe à travers les capillaires fœtaux dans le sens opposé au sang maternel qui traverse le spongiotrophoblaste en passant par les sinus artériels vers le labyrinthe où baignent les trophoblastes villosités (Adamson SL et al, 2002). Le remodelage des artères utérines est crucial, son défaut peut être responsable de retard de croissance intra-utérin.

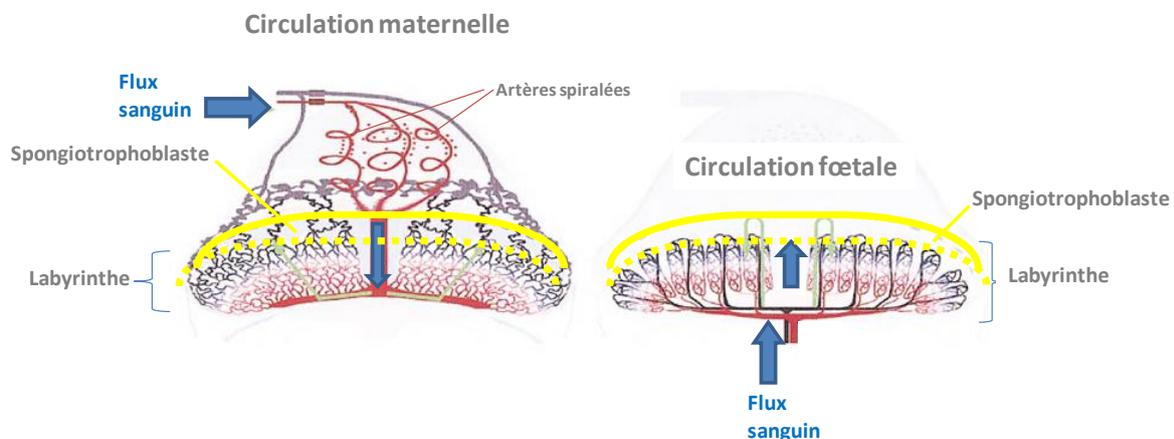


Figure 20 Circulation murine à contre-courant, d'après Adamson SL et al, 2002

POINTS-CLÉS

DIFFERENCES ET SIMILITUDES ENTRE PLACENTATION DU RAT ET L'HOMME

Paramètres	Rat	Homme
Vascularisation	A contre-courant	Simple, chorio-allantoïdienne
Implantation de l'embryon	Ectocentrique	Interstitielle
Modifications utérines	Décidualisation dépendante d'hormones et du stimulus implantation	Décidualisation dépendante d'hormones
Trafic immunitaire	Abondance de cellules NK et artères spiralées	Abondance de cellules NK et artères spiralées
Structure du placenta	Hémotrichorial	Hémomonochorial
Face fœtale placenta	Labyrinthe	Villosité choriale
Face maternelle placenta	Zone de jonction	Villosité choriale
Invasion du trophoblaste	Cellules trophoblastiques endovasculaires et interstitielles	Trophoblaste extra-villeux au sein de muqueuse utérine, intravasculaire, interstitielle
Remodelage artères spiralées	Disparition des cellules musculaires lisses, acquisition du phénotype endothélial des trophoblastes invasifs intravasculaires, paroi utérine atone	Disparition des cellules musculaires lisses, acquisition du phénotype endothélial destrophablastes invasifs intravasculaires, paroi utérine atone
Gestation	21-22 jours	9 mois

CHAPITRE IV

LES HORMONES PLACENTAIRES

Le placenta est un organe qui produit des hormones indispensables à l'établissement et au maintien de la grossesse. La production hormonale est variable selon les espèces. Il secrète chez l'Homme comme chez le rat, des hormones stéroïdes, des hormones polypeptidiques, dont nous allons décrire successivement les principales. La synthèse et la sécrétion de ces hormones ont lieu dans le syncytiotrophoblaste, unité endocrine active. C'est un tissu sexué car il possède le même caryotype que le fœtus. Il secrète à 99% dans la circulation maternelle du fait de sa polarisation (Linnemann K et al, 2000).

I- HORMONES STEROÏDES

La synthèse d'hormones stéroïdes à partir du cholestérol circulant maternel se fait dès 6 semaines de grossesse chez l'Homme, stade à partir duquel les enzymes de la stéroïdogénèse (*Figure 21*) y sont exprimées

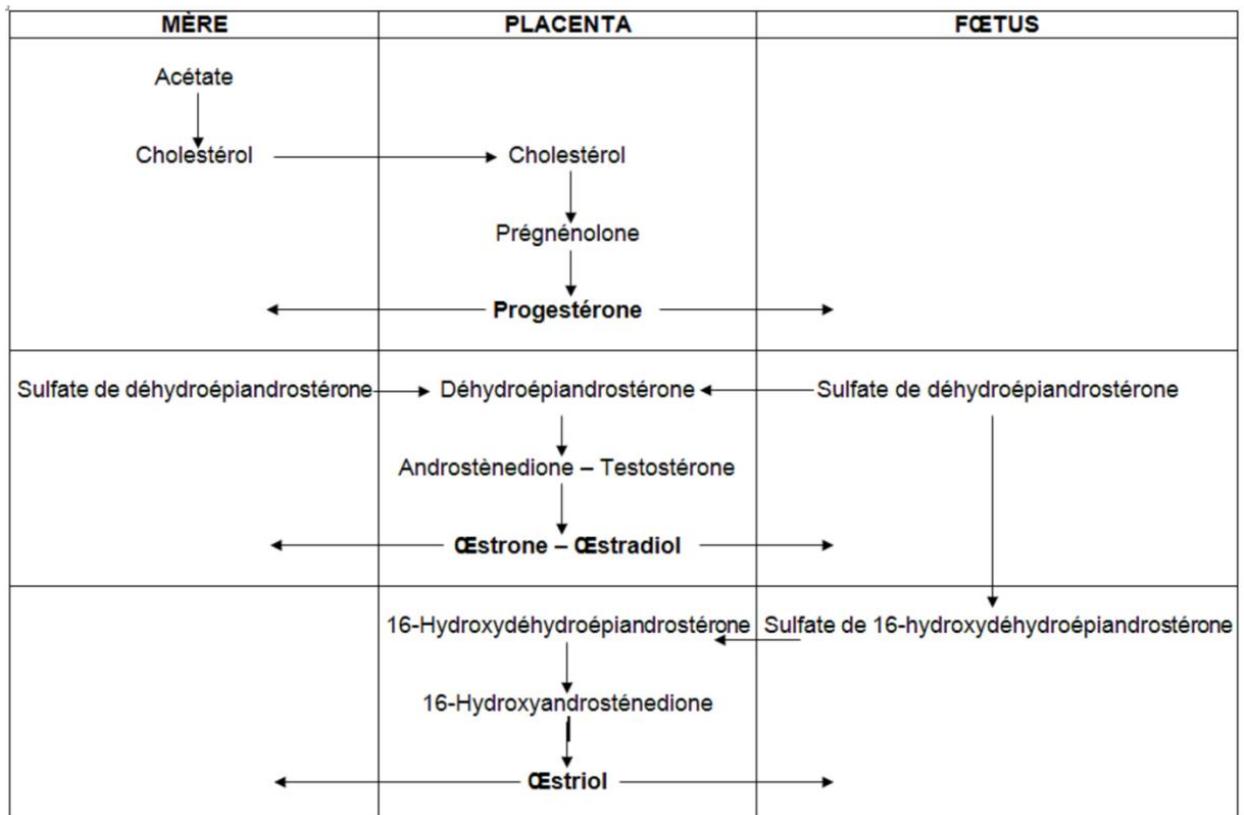


Figure 21 Stéroïdogénèse placentaire chez l'Homme, d'après UVMaF, 2011

A- LA PROGESTÉRONNE

La progestérone est essentiellement produite, chez l'Homme, pendant les 6 premières semaines de grossesse par le corps jaune gravidique puis par le placenta. Elle joue un rôle capital chez l'Homme dans le maintien au repos du myomètre indispensable au déroulement de la grossesse et à l'accouchement (Mesiano S et al, 2011). Elle inhibe l'invasion dans les cytotrophoblastes au début du premier trimestre (6 SA), puis active l'expression de la MMP-2 et donc l'invasion dans les cytotrophoblastes plus tardifs (12 SA). Ces effets inverses pourraient être expliqués par le profil d'expression du récepteur de la progestérone qui varie au cours de la grossesse (Goldman S et al, 2006).

Chez les murins, les cellules géantes trophoblastiques sont capables de produire de la progestérone à partir du cholestérol (Salomon et al, 1975), mais celle-ci participerait peu au maintien de la grossesse. Elle aurait un rôle trophique (Mark P et al, 2006). Quelques études ont indiqué que le placenta murin pouvait produire des androgènes à partir de la progestérone via la production de P450c17 (Itoh K et al, 2009 ; Warshaw et al, 1986).

B-LES ŒSTROGÈNES

La synthèse d'oestrogènes chez l'Homme par le placenta débute également dès 6 semaines de grossesse avec augmentation surtout à partir de la 9^{ème} semaine parallèlement à l'invasion trophoblastique et au remodelage des artères spiralées. Le placenta humain n'exprime pas la 17 β -hydroxylase-17:20 lyase qui convertit la progestérone et la prégénolone en androgènes, eux-mêmes substrats pour la synthèse des oestrogènes. Le placenta agit donc en complète coopération avec le fœtus pour cette synthèse. La synthèse est donc régulée par le sulfate de déhydroépiandrostérone (s-DHEA) produit par la surrénale maternelle et la surrénale fœtale (Rainey WE et al, 2004). Les oestrogènes stimulent la prolifération des cellules de l'endomètre et la différenciation des syncytiotrophoblastes chez l'Homme. Leur rôle ne semble pas indispensable au maintien de la grossesse (Cronier L et al, 1999).

Le placenta murin ne synthétise pas d'oestrogènes, il n'y a pas d'aromatase (Itoh K et al, 2009). Les androgènes placentaires sont prédominants.

II- HORMONE CHORIONIQUE GONADOTROPE (HCG)

L'HCG possède 2 sous-unités alpha et une sous-unité bêta spécifique et a un poids moléculaire de 37-kDa. La sous-unité bêta possède 2 sites de N-glycosylation (sur l'asparagine) et 4 sites d'O-glycosylation (sur des résidus –OH de la sérine et de la thréonine) et est codée par un « *cluster* » de sept gènes CG β localisé sur le chromosome 19, chacun étant composé de 3 exons et de 2 introns (Hallast P et al, 2005).

Elle est, chez l'Homme, sécrétée dès 7 jours après la fécondation, au moment de l'implantation et permet la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gravidique qui assure ainsi le maintien de la sécrétion de progestérone. Elle est le premier message de la grossesse. Sa forte glycosylation lui permet de se diriger vers le syncytiotrophoblaste avec un contact direct avec le sang maternel. Sa demi-vie est dépendante de la glycosylation. L'HCG dans le sang maternel est présente en fortes quantités avec un pic vers 8 semaines de grossesse, puis elle diminue et atteint un plateau jusqu'à l'accouchement (Cole LA et al, 1997).

Le placenta secrète quatre formes d'HCG: les sous-unités alpha et bêta libres, l'HCG non glycosylée et l'HCG glycosylée ou HCG-H. La sécrétion d'HCG-H est beaucoup plus faible que celle de l'HCG totale (1-12%) et sa cinétique est différente: très forte en début de grossesse puis en diminution à partir de 9 SA jusqu'à 19 SA, où elle représente moins de 1% de l'HCG totale. La sécrétion d'HCG-H par les trophoblastes a aussi été mise en évidence *in vitro* et les trophoblastes extravilleux invasifs sécrètent 4 à 6 fois plus d'HCG-H que le syncytiotrophoblaste (Guibourdenche J et al, 2010).

L'HCG a un rôle essentiel autocrine et paracrine dans la différenciation de cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste (Malassine A et al, 2010). Il est aussi un facteur angiogénique impliqué dans le développement du placenta. Il possède des propriétés angiogéniques similaires à celles du VEGF (Islami D et al, 2003) et son récepteur est présent sur les cellules endothéliales utérines (Toth P et al, 1994). *In vitro*, il favorise l'angiogenèse en favorisant la migration des cellules endothéliales utérines et leur capacité à former des structures capillaires (Berndt S et al, 2006). En 2007, Handschuh *et al.* ont montré également *in vitro* que l'HCG des cytotrophoblastes extravilleux invasifs était beaucoup plus exprimé que celui du cytotrophoblaste villeux avec un rôle différentiel entre ces deux populations cellulaires. L'HCG a un rôle de différenciation entre ces deux types de cellules dans l'invasion

trophoblastique (Handschuh K et al, 2007). Elle est régulée par de nombreux facteurs: l'œstradiol (Cronier L et al, 1999), l'EGF (Hess AP et al, 2007), l'oxygène (Remes Lenicov F et al, 2012), l'AMPc (Maymo J et al, 2012), les glucocorticoïdes (Wilson E et al, 1982), la leptine (Hardie L et al, 1997), la gonadotrophin releasing hormone (GnRH) (Shi L et al, 1994), les PPARs gamma (Shalom-barak T et al, 2012). Elle aurait enfin un rôle dans l'immunité locale (Dong M et al, 2008).

Le placenta murin ne produit pas d'HCG.

III- LA FAMILLE DES GROWTH HORMONE (GH)/ CHORIONIQUE SOMATOTROPHIQUE (CS) PLACENTAIRES

Chez l'homme, cette famille a 5 membres : le gène de la GH hypophysaire (*GH-N*); le gène de la GH placentaire (*GH-V*); les gènes *CS-A*; *CS-B* et *CS-L*. Ces gènes sont localisés sur un « cluster » sur le chromosome 17(q22-q24). Chaque gène code pour une protéine d'environ 200 acides aminés (Chen E et al, 1989). *GH-V* code pour une protéine de 191 acides aminés et 22-kDa, la GH placentaire. La GH placentaire diffère de 13 acides aminés avec la GH pituitaire et possède un site de glycosylation. *GH-V* n'est pas exprimé dans l'hypophyse mais spécifiquement au sein du trophoblaste (Chen E et al, 1989; Lacroix MC, 2005). De même *GH-N*, gène pituitaire, n'est pas exprimé au sein du placenta (Lacroix MC et al, 2005). La régulation de l'expression génique de *GH-V* est peu documentée. Malgré l'expression placentaire de Pit-1, ce facteur de transcription ne semble pas le réguler (Lacroix MC et al, 2005). Au sein du placenta, la concentration du gène *GH-V* est faible (0.05%), tandis que les concentrations des gènes *CS-A* et *CS-B* sont de l'ordre de 10-20% des mRNA totaux (MacLeod J et al, 1992).

Chez l'Homme, la GH placentaire, sécrétée majoritairement au sein d'un syncytiotrophoblaste, a un rôle majeur dans la croissance fœtale et le contrôle du métabolisme maternel, en particulier en modulant la sécrétion maternelle d'IGF-1. Elle stimule la néoglucogénèse, la lipolyse (Lacroix MC et al, 2005). En effet, elle est fortement sécrétée en cas de glycémie maternelle élevée, et permet le maintien d'un apport énergétique au fœtus, en inhibant notamment la captation du glucose au niveau musculaire (McIntyre H et al, 2000)

Elle remplace progressivement la GH maternelle qui devient indétectable au 2^{ème} trimestre. De récentes études ont fait état d'une expression du gène GH-V et de sa protéine au sein du cytotrophoblaste extra-villeux, suggérant une participation dans l'invasion trophoblastique (Lacroix MC et al, 2002).

Chez le rongeur, il n'y a pas d'expression du gène de la GH au niveau placentaire. Par contre, 4 GH-related protéines ont été isolées par culture cellulaire de placenta à E15 chez le rat. Elles ont 78 % d'homologie avec les précurseurs de la GH (Ogilvie S et al, 1990).

IV- LA FAMILLE PRL

La famille PRL est composée de protéines présentant de fortes homologies entre ses membres. Pour cette raison, ces protéines sont appelés "PRL-likes". Nous allons dans un premier temps décrire la famille PRL au sein du placenta chez l'Homme et le rongeur. Par la suite, nous nous intéresserons plus particulièrement à trois de ses membres: le lactogène placentaire, la PRL déciduale, et la Decidual prolactin related protein (DPRP). Chez le murin, ces ont les hormones placentaires prédominantes et essentielles au maintien de la grossesse.

A- LA FAMILLE PRL DANS LE PLACENTA CHEZ L'HOMME ET LE RONGEUR

La composition de cette famille PRL diffère d'une espèce à l'autre (Soares MJ et al, 2007). Ainsi, le rat possède 24 gènes sur le chromosome 17 codant pour ces protéines (Alam SM et al, 2006) alors que l'Homme ne possède qu'un seul membre, la PRL elle-même sur le chromosome 6 (Soares MJ et al, 2004). Les gènes de la souris sont situés sur le chromosome 13 (Wiemers DO et al, 2003). Chaque gène de cette famille code pour une protéine qui possède un lien avec la grossesse (Soares MJ et al, 2004). Chacune des expressions de ces gènes met en jeu un système de coordination entre les tissus maternels, fœtaux et extra-embryonniques et ce pendant toute la durée de la gestation.

1- Historique

L'existence d'hormones PRL-like dans les tissus utéro-placentaires remonte aux années 30 dans des études d'hypophysectomie chez le rongeur (Selye H et al, 1933). Il y avait tout de même formation de corps jaune et de glande mammaire après hypophysectomie en milieu de grossesse chez l'animal (Astwood EB et al, 1938). Ces deux fonctions avaient toujours été attribuées à la PRL pituitaire. Des extraits placentaires faisaient état d'activité lactogène et lutéale (Cerruti RA et al, 1960). Ceci a permis de découvrir quelques années plus tard l'existence de protéines utéro-placentaires (Talamantes F et al, 1980).

Ces protéines avaient des activités lactogène et lutéale. Il apparaît alors la notion d'appartenance à une famille PRL dite "classique" quand les membres avaient ces 2 fonctions classiques de la PRL (lactogène et lutéale) comme le lactogène placentaire (PL) et celle d'appartenance à une famille PRL dite "non classique". Des groupes de PRL-like ont progressivement vu le jour avec des expressions géniques distinctes ainsi qu'une fonction et une distribution au sein du tissu spécifiques. Selon les activités biologiques de ces protéines, on les classe en membres classiques ou non classiques (Soares MJ et al, 2004) (*Table 4*).

HORMONES	ESPECE (Rat/souris)
MEMBRES CLASSIQUES	
Prolactine (PRL)	Rat, souris
Lactogène placentaire-I (PL-I)	Rat, souris
Lactogène placentaire-II(PL-II)	Rat, souris
MEMBRES NON CLASSIQUES	
Prolactin-like proteins (PLPs)	
▪PLP-A	Rat, souris
▪PLP-B	Rat, souris
▪PLP-C	Rat
▪PLP-D	Rat
▪PLP-E	Rat
▪PLP-F	Souris
▪PLP-G	Souris
Proliférine (PLF)	Souris
Proliferin-related protein (PLF-RP)	Souris
Decidual prolactin-related protein (DPRP)	Rat, souris

Table 4 Membres classiques et non classiques de la famille PRL chez le rongeur, d'après Soares MJ et al, 2004

2- Membres classiques de la famille PRL utéroplacentaires

Les membres classiques sont ceux qui ont les fonctions dites classiques de la PRL à savoir lactogène et lutéale. Il s'agit surtout de la PRL elle-même qui fait bien-entendu aussi partie de cette famille et la sous-famille des lactogènes placentaires, initialement découverts.

Ce sont des agonistes du récepteur de la PRL (Soares MJ et al, 2004). Pendant les phases très précoces de la grossesse, la PRL pituitaire est le seul ligand pour son récepteur. Au fur et à mesure de la progression de la grossesse et de l'apparition des cellules trophoblastiques, il y a d'abord production de PL-I puis de PL-II.

3- Membres non classiques de la famille PRL utéroplacentaires

Les premières découvertes des membres de la famille PRL étaient basées sur une homologie de leurs effets biologiques avec ceux attribués au préalable à la PRL. Il est maintenant reconnu que certains membres utéro-placentaires de la famille PRL ont des actions dites "non classiques" de la PRL. Ils n'agissent pas par le biais du récepteur de la PRL et diffèrent selon les espèces (Soares MJ et al, 2004). Nous allons surtout les décrire chez le rongeur. L'Homme, on le rappelle n'en a aucun.

4- Similitude structurale

Chez le rat, nous avons vu que les gènes de la famille PRL étaient situés sur le chromosome 17. L'arrangement précis des gènes sur ce chromosome n'est pas totalement précisé.

Il y a une homologie de structure de la protéine appartenant à la famille PRL avec la PRL qui définit son appartenance. Ceci inclut la position des résidus cystéine au nombre de 4, conservés entre espèces, et la situation d'autres acides aminés clés. Ensuite, selon le nombre de résidus cystéine homologues au-dessus de 4, nous pouvons définir des sous-groupes (Soares MJ et al, 1998). Ainsi, nous avons le sous-groupe des 4; 5 ou 6 résidus de cystéine homologues (*Figure 22*).

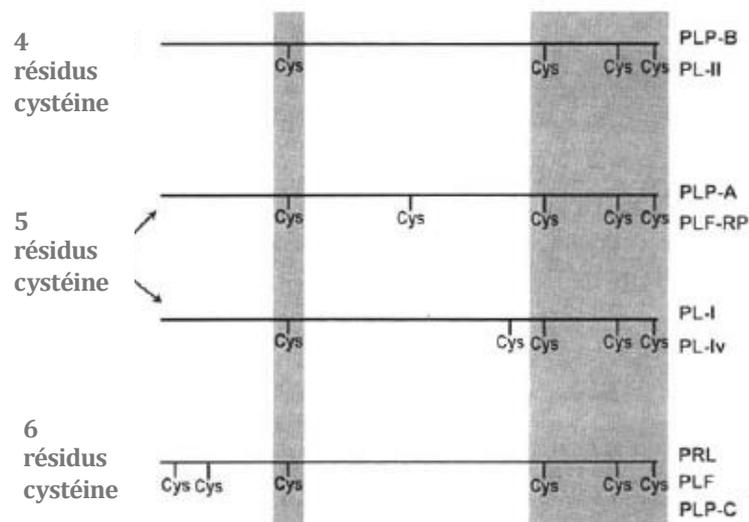


Figure 22 Similitude structurale selon le nombre de résidus cystéine des protéines de la famille PRL, d'après Soares MJ et al, 1998

5- "Patterns" d'expression des membres de la famille PRL

Ils peuvent être exprimés dans un type cellulaire, voire dans 2 ou 3 types cellulaires (*Table 5*). La source cellulaire va affecter directement le processus post-traductionnel, et donc potentiellement la distribution et l'activité du ligand. La localisation de la cellule impliquée dans la biosynthèse du ligand affecte également directement l'accès à la cellule cible (Soares MJ et al, 1998).

Membres de la famille PRL	Symboles	N° Genbank accession (souris)	N° Genbank accession (Rat)	Tissu d'expression
Prolactin	PRL	NM_011164	NM_012629	Hypophyse, Décidue
Placental lactogen-I α	PL-I α ; Csh1	AF525162	NM_017363	Trophoblaste
Placental lactogen-I β	PL-I β ; PliB	NM_172155	DQ329283	Trophoblaste
Placental lactogen-I γ	PL-I γ ; Plig	NM_172156	ND	Trophoblaste
PLP-J	PLP-J; Prlpi	NM_013766	NM_031316	Décidue
Placental lactogen-II	PL-II, Csh2	M14647	NM_012535	Trophoblaste
PRL-like protein I	PLP-I	AF525154	NM_153736	Trophoblaste
PRL-like protein B	PLP-B; Prlpb	NM_011166	M31155	Trophoblaste, Décidue
Decidual PRL-related protein	dPRP, Dtrp	NM_010088	NM_022846	Décidue
PRL-like protein K	PLP-K; Prlpk	NM_025532	NM_138861	Trophoblaste
PRL-like protein D	PLP-D; Prlpd	ND ^b	NM_022537	Trophoblaste
PRL-like protein C variant	PLP-Cv	ND	NM_020079	Trophoblaste
PRL-like protein C	PLP-C, Prlpc	ND	M76537	Trophoblaste
PRL-like protein H	PLP-H, Prlph	ND	NM_021580	Trophoblaste
Placental lactogen-I variant	PL-Iv, Csh111	ND	NM_033233	Trophoblaste
PRL-like protein C γ	PLP-C γ , Prlpc3	NM_023741	ND	Trophoblaste
PRL-like protein C β	PLP-C β , Prlpc2	NM_023332	NM_134385	Trophoblaste
PRL-like protein C δ	PLP-C δ , Prlpc4	NM_028477	ND	Trophoblaste
PRL-like protein C α	PLP-C α , Prlpc1	NM_011167	ND	Trophoblaste
PRL-like protein N	PLP-N; Prlpn	NM_029355	NM_153738	Trophoblaste
PRL-like protein E	PLP-E; Prlpe	NM_008930	ND	Trophoblaste
PRL-like protein F	PLP-F; Prlpf	NM_011168	ND	Trophoblaste
PRL-like protein F β	PLP-F β	-	AY741310	Trophoblaste
PRL-like protein F α	PLP-F α	-	NM_022530	Trophoblaste
PRL-like protein O	PLP-O; Prlpo	NM_026206	ND	Trophoblaste
Proliferin-related protein	PLF-RP	NM_011120	NM_053364	Trophoblaste
Proliferin 1	PLF1	NM_031191	ND	Trophoblaste
Proliferin 2	PLF2	K03235	ND	Trophoblaste
Proliferin 3	PLF3; Mrp3	NM_011954	ND	Trophoblaste
Proliferin 4	PLF4; Mrp4	AF128884	ND	Trophoblaste
PRL-like protein M	PLP-M; Prlpm	NM_019991	NM_053791	Trophoblaste
Proliferin	PLF	-	DQ329281	Trophoblaste
PRL-like protein A	PLP-A; Prlpa	NM_011165	NM_017036	Trophoblaste
PRL-like protein L	PLP-L; Prlpl	NM_023746	NM_138527	Trophoblaste
PRL-like protein P	PLP-P; Prlpp	ND	DQ329280	Trophoblaste

Table 5 Tissu d'expression des différents membres de la famille PRL, d'après Soarès MJ et al, 2007

a- Expression cellulaire exclusive dans les cellules trophoblastiques

Les cellules trophoblastiques ont la capacité d'exprimer la plupart des membres de la famille PRL, et sont les sources exclusives des lactogènes placentaires et de la proliférine, soit des membres classiques (Soares MJ et al, 1985).

b- Expression cellulaire double (cellules trophoblastiques et du spongiotrophoblaste; cellules du spongiotrophoblaste et cellules déciduales)

L'expression double dans les cellules trophoblastiques et du spongiotrophoblaste concerne surtout les Prolactin-Like Proteins (PLP): PLP-A, PLP-C, PLP-D, PLP-E. PLP-B possède une expression cellulaire double unique de cellules maternelles et extra-embryonnaires (Soares MJ et al, 1998). Le tissu antimésométrial déciduale est la source première de PLP-B en début de

grossesse puis le spongiotrophoblaste prend le relai en dernière partie. C'est à ce jour le seul membre non exprimé dans les cellules trophoblastiques (Ogilvie S et al, 1998).

c- Expression tissulaire triple (décidue, trophoblaste, spongiotrophoblaste)

Ceci concerne la DPRP. Son gène est exprimé dans les cellules déciduales anti-mésométriales en début de grossesse, puis par les spongiotrophoblastes et les cellules géantes trophoblastiques en 2^{ème} partie de grossesse (Orwig KE et al, 1997; Rasmussen CA et al, 1997).

d- Expression cellulaire déciduale

4 membres de la famille PRL sont d'expression déciduale: la PLP-J; la DPRP; la PLP-B et la PRL (Soares MJ et al, 2007).

6- Régulation des membres de la famille PRL

La similitude structurale, les "patterns" communs d'expression des membres de la famille PRL suggèrent des points communs dans leur régulation.

Très peu d'études ayant étudié les membres utéro-placentaires au niveau du placenta sont décrites dans la littérature. Les études *in vitro* utilisant des cultures primaires de cellules trophoblastiques ou des lignées cellulaires déciduales sont également peu nombreuses (Soares MJ, 1987 ; Thordarson G et al, 1987). Des médiateurs inflammatoires intra- ou extracellulaires comme les interleukines 1 et 6, le TNF-alpha, le TGF-bêta, ont été proposés en tant que candidats régulateurs sur des lignées cellulaires trophoblastiques Rcho-1 mais le lien direct n'a pas été démontré (Yamaguchi M, et al, 1995). Ces études très limitées ont été axées sur les membres classiques de la famille PRL et non pas sur les membres non classiques.

7- Transport et distribution tissulaire de la famille PRL

Certains membres comme le Lactogène Placentaire peuvent se retrouver dans la circulation maternelle grâce à des transporteurs comme l'alpha2-macroglobuline (Southard JN

et al, 1989). D'autres comme la DPRP, ont une distribution utéro-placentaire locale et ne se retrouvent pas dans la circulation maternelle. La DPRP se lie à l'héparine et est présente dans la matrice extracellulaire déciduale. Elle peut ainsi, par sa localisation privilégiée traverser le compartiment décidual et s'exposer à la limite des sites extra-utérins (Rasmussen CA et al, 1996).

8- Fonctions biologiques de la famille PRL dans le placenta

De plus en plus de données dans la littérature décrivent un rôle dans la régulation des mécanismes adaptatifs de la grossesse de la famille PRL.

On distinguera les fonctions plus "PRL-like" dites classiques comme la lutéinisation, la lactation comme celles des lactogènes placentaires (Thordarson G et al, 1997). Les effets des PRL-like dits non classiques sont beaucoup moins connus et très peu de progrès ont été faits dans ce domaine ces dernières années. Ce qui est certain, c'est que du point de vue mécanistique, ils sont indépendants du récepteur de la PRL, ce qui n'est pas le cas des PRL-like dits "classiques" (Soares MJ et al, 2007). Leur action se résume plus à un rôle d'ajustement dans les tissus materno-fœtaux. Ils ont un rôle dans l'hématopoïèse activée dans les tissus extra-embryonnaires comme PLP-E et PLP-F (Zhou B et al, 2002). Ils peuvent aussi avoir un rôle d'interaction avec les cellules NK qui stimulent le remodelage des artères utérines comme PLP-A (Ain R et al, 2003).

La famille PRL jouerait un rôle d'adaptation à des situations de stress. Ainsi, les mutations chez la souris de certains gènes de la famille PRL ont été étudiées. quatre mutations ont été générées: mutation du gène *Prl* (Horseman K et al, 1997; Ormandy CJ et al, 1997), mutation du gène *plpa* (Ain R et al, 2004), mutation du gène *Dprp* (Alam SM et al, 2007) et du gène *Plpe* (Zhou B et al, 2005), que nous allons décrire.

La PRL est connue pour son rôle de modulation du système immunitaire. Des souris mutées pour le gène *Prl* (Horseman ND et al, 1997) et celui du récepteur à la PRL (Ormandy CJ et al, 1997) ont démontré que la signalisation de la PRL n'était pas indispensable au développement du système immunitaire. Par contre, la PRL était cruciale pour la régulation de la réponse immune aux différents facteurs de stress. Le développement de lignées myéloïdes

provenant de la moelle osseuse et des lignées de lymphocytes T spléniques était insuffisant chez la souris invalidée pour le gène *Prl*.

La PLP-E est une hormone trophoblastique qui stimule l'erythropoïèse et la mégacaryocytopoïèse (Zhou B et al, 2002). La souris transgénique pour le gène *Plpe* où le gène *Plpe* était surexprimé, récupérait beaucoup plus vite que la souris contrôle à une situation provoquée chimiquement de thrombopénie et de neutropénie (Zhou B et al, 2005).

Dans des situations provoquées d'hypoxie fœtale, des expériences chez la souris invalidée pour le gène *Dprp* (Alam SM et al, 2007) ou pour le gène *Plpa* (Ain R et al, 2004) aboutissaient à une interruption précoce de la grossesse et ce chez la totalité des animaux. PLP-A et DPRP sont donc indispensables à la survie du fœtus en cas de facteur de stress type hypoxie.

B- L'HORMONE LACTOGÈNE PLACENTAIRE (PL)

L'hormone placentaire chez l'Homme, prépare à la lactation en préparant la glande mammaire. Elle possède 85% d'homologie avec la GH et 13% d'homologie avec la PRL. Elle peut être détectée dans le sang maternel entre 20 et 40 jours de gestation. Sa concentration augmente rapidement et atteint un plateau vers 34 semaines. Son rôle majeur est l'activation de la lipolyse maternelle. Elle a aussi la capacité d'induire une insulino-résistance chez la mère, ce qui favorise le transfert du glucose vers le fœtus. Elle suit l'évolution de la masse syncytiale (Walker W et al, 1991).

Chez le rongeur PL-I et PL-II stimulent la croissance épithéliale mammaire ainsi que la différenciation et facilitent l'intégrité du corps jaune et la libération de progestérone (Soares MJ et al, 2007).

C- LA PRL DÉCIDUALE

La PRL est surtout connue pour sa production hypophysaire mais a aussi une production déciduale par les cellules stromales chez l'homme comme chez le rongeur (Prigent-Tessier A et al, 1999).

1- Structure de la PRL déciduale

La PRL déciduale est synthétisée sous forme d'un précurseur de 26 kDa possédant un peptide signal qui est ensuite clivé pour générer la forme active de 23 kDa. Elle a la même homologie structurale que la PRL hypophysaire chez le rat (Prigent-Tessier A et al, 1999) et chez l'Homme (Takahashi H et al, 1984). La séquence protéique est conservée entre espèces, elle est identique à 67% entre l'homme et le rat (Sinha YN et al, 1995).

2- Production au cours de la grossesse

Sa production débute avant la grossesse et ce pendant toute la durée de la grossesse avec un pic de production entre 20-25 semaines de grossesse chez l'Homme (Ben-Jonathan N, 1996; Wu WX et al, 1995). Chez le rat, elle est produite dans les cellules anti-mésométriales et dans les cellules déciduales de la décidue, à des taux très faibles en début de grossesse, avec pic à E12. Après E12, sa production chute brutalement puis diminue jusqu'au terme. À partir d'E12, elle est pratiquement indétectable dans les cellules antimésométriales (Prigent-Tessier A et al, 1999).

3- Mode d'action

Elle agit chez l'Homme (Kline JB et al, 1999) comme chez le rat (Kelly PA et al, 1991) via un récepteur avec un domaine transmembranaire appartenant à la classe des récepteurs cytokine de classe 1 avec 2 isoformes, la forme longue et la forme courte. Ces récepteurs ont un domaine extracellulaire de 210 acides aminés de structure similaire mais différent dans la longueur de leur domaine intracytoplasmique. L'expression de ces récepteurs dans l'utérus est régulée par le cycle menstruel (Jabbour HN et al, 1998). Leur expression est localisée exclusivement dans les cellules épithéliales glandulaires de l'endomètre en absence de grossesse (Jabbour HN et al, 1998). En cas de grossesse, l'expression sera alors présente au niveau des cellules déciduales, du cytotrophoblaste, du syncytiotrophoblaste, de l'épithélium amniotique chez l'Homme (Maaskant RA et al, 1996).

L'induction de l'expression de la PRL déciduale dépend d'une voie de signalisation AMP cyclique dépendante via la protéine kinase A (Kusama K et al, 2013). Une fois activée, la PRL déciduale agit dans l'endomètre via une voie de signalisation Jak2/Stat. Elle active la

phosphorylation de Jak2, STAT 1 et STAT 5 (Jabbour HN et al, 1998). Les galectines (Gal) sont des protéines connues dans l'apoptose, la migration cellulaire et ont un rôle dans l'invasion trophoblastique. Elles sont impliquées dans la physiopathologie de la prééclampsie, des fausses couches spontanées. Des études très récentes in vitro sur des cellules trophoblastiques en culture humaines, retrouvent un lien entre la PRL, l'expression du gène de la Gal-1, et l'invasion trophoblastique. En présence de PRL dans le milieu de culture, l'expression protéique de Gal-1 est augmentée en western-blot ainsi que l'invasion trophoblastique, mais le mécanisme direct n'est pas démontré (Stefanoska I et al, 2013).

4- Fonction biologique

Elle intervient au niveau de l'implantation du blastocyste sur la muqueuse utérine (Jabbour HN et al, 2001). L'implantation fait défaut en cas de souris inactivées pour le gène de la PRL (Horseman ND et al, 1997) ou de son récepteur (Ormandy CY et al, 1997) et les souris sont stériles. Elle régule aussi l'invasion trophoblastique de l'endomètre via un candidat potentiel, l'interferon bêta, le mécanisme reste inexpliqué (Meager A et al, 1998). Enfin, elle a un rôle proangiogénique (Struman I et al, 1999) et intervient dans la régulation immunitaire (Christian M et al, 2001).

Son action reste locale autocrine / paracrine (Eyal O et al, Biol Reprod, 2007) et elle n'est pas déversée dans la circulation maternelle et fœtale (Ben-Jonathan N et al, 1996).

5- Régulation

La régulation de la PRL est par contre tissu-spécifique. En effet l'expression du gène de la PRL pituitaire est sous la dépendance de Pit-1 (Ingraham HA et al, 1990), facteur de transcription non exprimé dans l'utérus (Gellersen B et al, 1994). Sa production n'est pas influencée non plus par les régulateurs classiques de la production hypophysaire en PRL (bromocriptine, dopamine, TRH, estrogènes) (Huang JR et al, 1987). Elle est surtout régulée dans la décidue par la progestérone (Prigent-Tessier A et al, 1999). En présence de progestérone, l'endomètre décidualisé secrète de la PRL à des concentrations croissantes et cesse cette production dans les 2-3 jours en cas d'absence de celle-ci. (Maslar IA et al, 1986).

D'autres facteurs augmentent la sécrétion de la PRL déciduale *in vitro* lorsque les cellules déciduales sont en culture incluant l'IGF-1 (Rosenberg M et al, 1991).

6- Maturation de la PRL

La PRL peut présenter différentes modifications post-traductionnelles: glycosylation, phosphorylation ou clivage enzymatique. Le clivage de la PRL permet de générer plusieurs fragments chez le rat et l'humain de taille différente (22, 16, 17, 15, 14 et 8 kDa) à partir de la PRL de 23-kDa (Corbaccho AM et al, 2002; Ferraris J et al, 2011). Ces fragments possèdent des propriétés physiologiques différentes de la PRL qui elle est plutôt proangiogénique (Struman I et al, 1999), avec des propriétés anti-angiogéniques et pro-apoptotiques (Ferraris J et al, 2011). C'est pour cette raison, que l'on peut les classer dans la famille des vasoinhibines. Les vasoinhibines diminuent l'activité du VEGF induite par l'eNOS dans les cellules endothéliales (Gonzalez C et al, 2008) et l'apport exogène de NO restaure cette activité (Ziche M et al, 2000).

a- Enzymes de clivage de la PRL

Plusieurs enzymes sont capables de cliver la PRL pour générer des vasoinhibines selon le pH du milieu avec entre autres: certaines MMPs (Macotela Y et al, 2006), la cathepsine D (Piwnica D et al, 2004); la Bone Morphogenic Protein-1 (BMP-1) (Ge G et al, 2007). Il est très probable que le profil d'expression des différents fragments de la PRL soit tissu-spécifique.

La cathepsine D

Les protéases de la famille cathepsine font partie des hydrolases lysosomales les plus étudiées. Elles dégradent les protéines à pH acide. Elles sont classées selon la séquence en acides aminés de leur site actif. Ainsi, le site actif de la cathepsine D est l'aspartate (Yonezawa S et al, 1988).

La cathepsine D est ubiquitairement distribuée dans les lysosomes (Yonezawa S et al, 1988.) Le pH acide est indispensable à son activité avec *in vitro* un pH optimum de 4.5-5.0. Il n'existe pas d'inhibiteur naturel de la cathepsine D (Piwnica D et al, 2004). Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'un précurseur, la pré-pro-cathepsine D, qui va

subir de nombreux clivages durant sa biosynthèse pour aboutir à sa forme définitive mature et active. La perte de son peptide signal va former la pro-cathepsine D de 52 kDa qui via son récepteur mannose-6-phosphate est clivée et génère une forme intermédiaire active de 48-kDa. Il existe une voie alternative de formation de la cathepsine D de 48 kDa indépendante du mannose-6-phosphate, mais moins bien connue (Rodriguez A et al, 1997).

La cathepsine D, parmi ses nombreuses actions, est aussi connue pour cliver la PRL pour générer des vasoinhibines (Piwnica D et al, 2004). La cathepsine D clive la PRL chez le rat et chez l'humain avec des sites de clivage différents. La PRL de rat a 2 sites de clivage pour la cathepsine D, entre les résidus 145-146 et 148-149 (Baldocchi RA et al, 1993). Chez l'humain, la PRL a 2 sites de clivage supplémentaires entre les résidus 132-133 et autour du résidu 85. Ces 4 sites de clivage de la PRL humaine sont tous situés dans la même région (Piwnica D et al, 2004). Par spectrométrie de masse, il a été démontré que les fragments de PRL chez le rat et chez l'homme n'avaient pas la même masse moléculaire, étant plus longs ou plus courts. Chez l'homme, elle génère des fragments de PRL d'environ 15-kDa, de 16.5-kDa, de 17-kDa. Chez le rat, la cathepsine D génère plutôt des fragments d'environ 16-kDa. et 16.5-kDa. Il a été démontré que tous ces fragments ont des propriétés antiangiogéniques (Baldocchi RA et al, 1993; Piwnica D et al, 2004).

Ainsi, une augmentation du ratio des vasoinhibines au détriment de la PRL 23-kDa dans le placenta dans un milieu acide en cas d'activation de la cathepsine D aboutirait à une diminution de l'angiogénèse et une augmentation de l'apoptose qui entraînerait une nouvelle acidification du milieu (Piwnica D et al, 2004). Ceci va permettre une majoration de l'activation de la cathepsine D et, en retour, une production plus importante des différents fragments de la PRL.

Les métalloprotéases (MMPs)

La PRL 23 kDa peut également être clivée à pH neutre par les MMPs (Macotela Y et al, 2006). La protéolyse extracellulaire joue un rôle essentiel dans le processus d'angiogénèse à différents niveaux.

Les MMPs sont une famille d'enzymes protéolytiques intervenant dans l'homéostasie et dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Les cellules cytotrophoblastiques produisent

des MMPs impliquées dans l'invasion du trophoblaste dans les premiers stades de grossesse. Ainsi, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 et MMP-13 sont capables de cliver la PRL humaine en fragments d'environ 16-kDa (Macotela Y et al, 2006). Il a été proposé que la production de PRL déciduale et l'activité des MMPs cytotrophoblastiques conduisent à une protéolyse de la PRL locale au niveau de l'interface materno-fœtale pour générer des vaso-inhibines.

La BMP-1

La BMP-1 est une protéine ayant une structure similaire avec certaines MMPs et est capable de clivage de la PRL entre les résidus 159-160 chez le rat et chez l'homme et génère des fragments de PRL d'environ 17-kDa aux propriétés anti-angiogéniques (Ge G et al, 2007).

b- Implication clinique connue des vaso-inhibines

Implication dans la prééclampsie

Il est suggéré dans plusieurs études dans la littérature que les vaso-inhibines puissent jouer un rôle dans la physiopathologie de la prééclampsie (Parra A et al, 2002) ou dans l'hypertension artérielle gravidique (Masumoto A et al, 2010).

Implication dans le diabète

Peu d'études cependant décrivent les vaso-inhibines dans le diabète. Quelques rares études, toutefois, s'y sont intéressées dans la rétinopathie diabétique (RD). Historiquement, on évoquait déjà un lien entre RD et hypophyse dans les années 50 après la constatation d'une amélioration clinique de la RD en cas d'insuffisance pituitaire du post-partum (syndrome de Sheehan) (Poulsen JE et al, 1953). Des thérapies émergeaient alors à type d'hypophysectomie dans le but d'améliorer la RD (Saglam S et al, 1970), ce qui n'est plus d'actualité de nos jours. Il semblerait que les vaso-inhibines aient un rôle protecteur dans la progression de la RD par leur action antiangiogénique dans l'œil et leur action bloquante sur la vasoperméabilité de la rétine (Triebel J et al, 2011).

D-LA DPRP AU SEIN DU PLACENTA

On notera qu'il n'y avait pas d'autre implication de la famille PRL au sein de notre étude transcriptomique, autrement dit, pas d'autre gène de cette famille différenciellement exprimé dans les groupes diabétiques comparés au groupe contrôle. Comme dans notre étude transcriptomique, le seul gène différenciellement exprimé chez nos rates gestantes diabétiques était *Dprp*, seul celui-ci sera détaillé par la suite.

1- Structure

La DPRP est une protéine de 29-kDa isolée dans la décidue au niveau de la matrice extra-cellulaire dont le rôle exact n'est pas connu (Roby KF et al, 1993). Elle est la PRL-like la plus abondante produite par la décidue du rat en milieu de gestation. Elle a été découverte en 1993 dans des travaux sur la décidue de rat alors qu'on essayé de caractériser une autre prolactine-like, la PLP-B (Roby KF et al, 1993).

Elle est synthétisée sous la forme d'une pro-hormone avec un peptide signal hydrophobe de 28 acides aminés. Le peptide signal est clivé entre la sérine et la valine pour générer une protéine mature de 211 acides aminés (*Figure 23*).

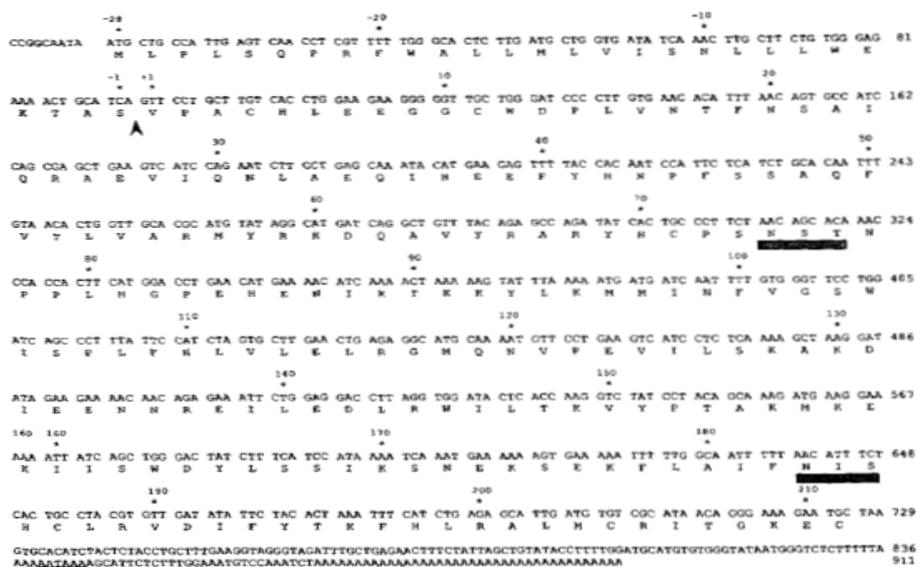


Figure 23 Séquence nucléotidique et en acides aminés de la DPRP, d'après Roby KF et al, 1993

Une fois isolée, il s'est avéré qu'elle était plus proche structurellement de la PLP-C (57% d'homologie), ce qui a facilité son clonage et sa caractérisation (Roby KF et al, 1993). C'est un membre ayant une séquence de 6 résidus cystéine homologue à la PRL (Orwig KE et al, 1997). La production utérine déciduale de DPRP et celle du placenta chorio-allantoïque sont inversement corrélés (Rasmussen CA et al, 1997).

2- Localisation

La DPRP est sécrétée en tant que glycoprotéine, d'abord dans la matrice extracellulaire de la décidue en début de grossesse, où elle se lie avec une forte affinité à l'héparine, puis au niveau du spongiotrophoblaste et du trophoblaste en 2ème partie de grossesse. On notera tout de même, qu'elle est beaucoup plus abondante dans la décidue que dans le placenta chorioallantoïque (Rasmussen CA et al, 1997).

En début de grossesse, elle est captée dans la matrice extracellulaire de la décidue où elle se lie aux molécules contenant de l'héparine et a accès aux éosinophiles qui sont ses cellules cibles (Wang D et al, 2000). Au fur et à mesure de la progression de la grossesse, la DPRP est produite par la zone de jonction (Rasmussen CA et al, 1997). Par contre, comme elle se lie à l'héparine et que la zone de jonction n'a pas d'heparan sulfate protéoglycane, elle diffuse probablement.

3- Fonction biologique

La DPRP est la seule PRL-like avec la PLP-J (Alam SM et al, 2008) à lier l'héparine tout comme la PRL d'ailleurs (Khurana S et al, 1999) et ceci est une piste intéressante pour son mode d'action qui n'est pas encore connu. Sa haute affinité pour l'héparine la place à une position clé de modulation des événements héparine-dépendants pour l'établissement de la grossesse (Wang D et al, 2000).

La DPRP est un activateur des effets biologiques dits "classiques" de la PRL mais aussi "non classiques" (Alam SM et al, 2007; Soares MJ et al, 2007). Elle ne se lie pas au récepteur de la PRL et n'influence pas le développement de la vascularisation placentaire dans des essais

in vitro et *in vivo* (Rasmussen CA et al, 1997). D'autres études ont fait état d'une implication d'éosinophiles dans le mécanisme d'action de la DPRP, en tant que cible éventuelle (Wang D et al, 2000). Les éosinophiles sont des composants de la réponse inflammatoire. Ceci a contribué à l'hypothèse du rôle de la DPRP dans la décidue à des situations de stress et à conduit à étudier des rats invalidés pour le gène *Dprp* dans des conditions de stress afin d'essayer de mieux caractériser son effet biologique.

Alam et al. ont montré chez la souris invalidée pour le gène *Dprp* en situation d'hypoxie fœtale que le déficit en *Dprp* résulte en une interruption de grossesse et ce très précocement au 7.5^{ème} jour de gestation. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un rôle de *Dprp* dans l'adaptation à la situation d'hypoxie pour maintenir la grossesse et donc la survie du fœtus (Alam SM et al, 2007).

V- LA LEPTINE PLACENTAIRE

Son rôle physiologique à la fois chez l'Homme et le rongeur sera décrit au sein du chapitre 5 de cette introduction.

VI- L'ADIPONECTINE PLACENTAIRE

L'adiponectine est une protéine de 30-kDa aux propriétés anti-inflammatoires, antiprolifératives. Elle orchestre ses effets via deux récepteurs transmembranaires de type 1 (ADIPOR1) et de type 2 (ADIPOR2) selon des voies de signalisations AMP-protéine kinase A, phosphoinositide-3-kinase (PIK3), mitogen-activated protein kinase (P38/P42/P44 MAPK) (Aye I et al, 2013), et JUN kinase (Chen H et al, 2014).

Son expression a été décrite dans le placenta (Takemura Y et al, 2006). L'adiponectine maternelle ne traverse pas la barrière foeto-placentaire. Pendant la grossesse, l'expression du récepteur dans le placenta est la plus élevée pendant la période de l'implantation, suggérant un rôle pour cette hormone à cette période. Des travaux récents, lui prouvent un rôle dans l'invasion trophoblastique en modulant l'expression des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9) qu'elles activent (Benaitreau D et al, 2010). Enfin, elle favorise la réduction de la signalisation insulinique placentaire avec diminution de la croissance fœtale et du transport insulino-dépendant en acides aminés (Jones H et al, 2010).

POINTS-CLÉS

DIFFERENCES ET SIMILITUDES HORMONALES ENTRE LE RONGEUR ET L'HOMME AU SEIN DU PLACENTA

Hormones	Rat	Homme
Progestérone	Oui, rôle mineur dans la grossesse	Oui, rôle maintien de la grossesse
Oestrogènes	Non	Oui
GH placentaire	Non mais des « GH-related protéines »	Oui
Famille PRL	De nombreux membres, "PRL-like", 24 gènes	2 seuls membres : la PRL et l'hormone placentaire, aucun membre « non classique »
Hormone placentaire (PL)	Oui, 2 types: PL-I et PL-II, facilitent la croissance épithéliale mammaire, la libération de la progestérone par le corps jaune	Oui, activation de la lipolyse maternelle, prépare à la lactation
PRL déciduale	Oui, proangiogénique, implantation du blastocyste	Oui, proangiogénique, implantation du blastocyste
Vasoinhibines	Oui, résultat du clivage de PRL, antiangiogéniques	Oui, résultat du clivage de PRL antiangiogéniques
Enzymes de clivage de la PRL	Oui, BMP-1; cathepsine D, MMPs	Oui, BMP-1; cathepsine D, MMPs
DPRP	Rôle peu connu, maintien de la grossesse en situation de stress ?	Non
Leptine et Adiponectine	Oui, capacités prolifératives et anti-apoptotiques sur les cellules trophoblastiques, stimule l'angiogénèse placentaire, le remodelage des artères spiralées et l'invasion trophoblastique	Oui, capacités prolifératives et anti-apoptotiques sur les cellules trophoblastiques, stimule l'angiogénèse placentaire, le remodelage des artères spiralées et l'invasion trophoblastique

CHAPITRE V

IMPACT DU DIABÈTE MATERNEL SUR L'UNITÉ FŒTO-PLACENTAIRE

Il est actuellement admis que l'environnement diabétique intra-utérin affecte le développement de l'unité fœto-placentaire de façon variable. En effet, le type de diabète maternel, le moment de l'exposition à l'hyperglycémie ainsi que la sévérité de l'hyperglycémie sont des paramètres qui interviennent. En effet, une hyperglycémie maternelle et fœtale va impacter le métabolisme, la croissance et le développement foeto-placentaires. L'unité fœto-placentaire doit faire face à un transfert accru de nutriments (glucose, acides aminés, lipides) auquel elle doit s'adapter pour assurer la survie du fœtus. Les principaux mécanismes adaptatifs seront détaillés dans ce chapitre.

I- TRANSFERT ACCRU DE NUTRIMENTS VERS LE FŒTUS

A- AFFLUX DE GLUCOSE

1- Lors d'une grossesse physiologique

Le glucose est le principal substrat énergétique au développement du fœtus. Il arrive chez le fœtus via la circulation maternelle par diffusion facilitée ou par le biais du métabolisme placentaire. Le transport placentaire du glucose est médié par des transporteurs de la famille des GLUTs (glucose transporters) à travers la membrane plasmique (Baumann MU et al, 2002). Au cours de la grossesse, durant le 1er trimestre GLUT1 et GLUT3 sont exprimés au niveau du syncytiotrophoblaste et de la membrane plasmique du cytotrophoblaste tandis que GLUT4 est exprimé dans le cytosol des membranes périnucléaires dans le syncytiotrophoblaste. A terme, l'expression de GLUT1 est prédominante et augmentée en comparaison avec le 1er trimestre tandis que l'expression de GLUT3 et GLUT4 diminue (Ericsson A et al, 2005).

2- Dans le cadre d'un diabète maternel

Le transfert transplacentaire du glucose n'est pas altéré, malgré une augmentation de l'expression de certains transporteurs placentaires comme le GLUT1. Il n'y a pas de différence de concentration en glucose entre la veine et l'artère ombilicale (Gaither K et al, 1999). Le flux élevé de glucose dans le placenta résulte surtout du passage passif du glucose maternel selon un gradient de concentration vers la circulation fœtale. Dans les modèles animaux de rat traités par la streptozotocine (STZ) et rendus diabétiques, le glucose circulant est élevé avec une

expression variable de GLUT1 selon les études (Ogura K et al, 1999). Chez l'homme, l'expression de GLUT1 est augmentée dans le placenta issu de femmes diabétiques malgré un bon contrôle de la glycémie sous insulinothérapie suggérant que GLUT1 est le principal GLUT impliqué dans les voies de signalisation de l'insuline (Gaither K et al, 1999). L'expression de GLUT3 placentaire a été retrouvée élevée dans le placenta à E20 d'un modèle de diabète maternel chez le rat (Boileau P et al, 1995).

B- AFFLUX DE LIPIDES

1- Lors d'une grossesse physiologique

Au cours de la grossesse normale, les acides gras sont essentiels au développement fœtal et à sa croissance non seulement parce que ils sont une source énergétique mais aussi parce qu'ils ont impliqués dans les fonctions métaboliques et structurales du fœtus (Haggarty P et al, 2010). Les acides gras du fœtus dérivent surtout de la circulation maternelle comme les Acides Gras Libres ou ceux entrant dans la composition des lipoprotéines mais doivent franchir la barrière placentaire avant d'arriver dans la circulation fœtale. Les Triglycérides maternels (TGs) sont la source d'acides gras préférentielle en comparaison aux acides gras non estérifiés (Haggarty P et al, 2010). La Lipoprotéine Lipase (LPL) placentaire hydrolyse les triglycérides en acides gras des *Low density lipoproteins* (LDL) et des *Very Low density lipoproteins* (VLDL).

Le transfert des lipides placentaire est facilité grâce à (Biron-Shental T et al, 2007; Duttaroy AK et al, 2008):

- ❖ de nombreux récepteurs placentaires aux lipoprotéines (récepteurs des LDLs, VLDLs),
- ❖ des protéines de transport des lipides intra-cellulaires, les *Fatty acid binding protein* (FABPs),
- ❖ des protéines de transfert des lipides intra-membranaires, les *Fatty acid transfer protein* (FATPs)
- ❖ la *Fatty Acid Translocase* (FAT/CD36) dans le placenta humain, impliquée dans l'absorption des acides gras.

Les FAT/CD36 et FATBP1 sont présentes sur les membranes des microvillosités du

syncytiotrophoblaste (Kazantzis M et al, 2012; Mishima T et al, 2011). Au cours des 1^{er} et 2^{ème} trimestres, la lipogenèse et l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) sont augmentées. Au 3^e trimestre, la tendance est inverse avec une lipolyse accrue, favorisée par l'insulinorésistance (Lindegaard ML, 2005; Waterman IJ et al, 1998).

2- Dans le cadre d'un diabète maternel

Le diabète maternel est associé à des anomalies du profil maternel lipidique, de la synthèse et du transport des lipides à travers le placenta vers le fœtus. Les gènes du transport et de l'activation des acides gras et des LDLs sont surexprimés dans le placenta, ce qui reflète l'augmentation de la disponibilité des substrats lipidiques à l'interface fœto-placentaire en cas de diabète prégestationnel de type 1 et de diabète gestationnel. Les gènes des voies de biosynthèse de lipides intracellulaires sont sélectivement surexprimés au niveau placentaire en uniquement cas de diabète gestationnel, ce n'était pas le cas dans le cadre du diabète prégestationnel de type 1 (Radaelli T et al, 2009) (*Figure 24*).

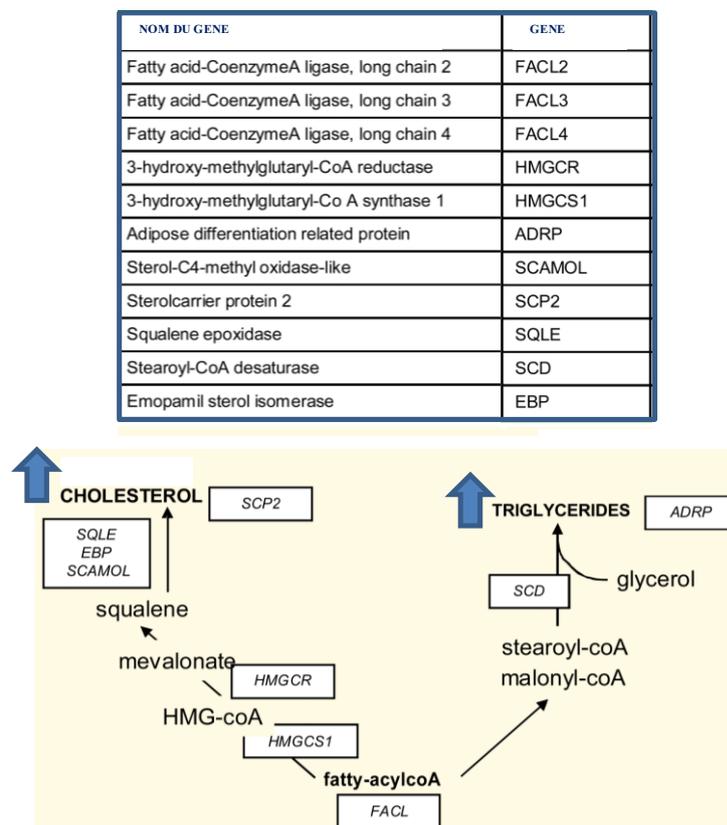
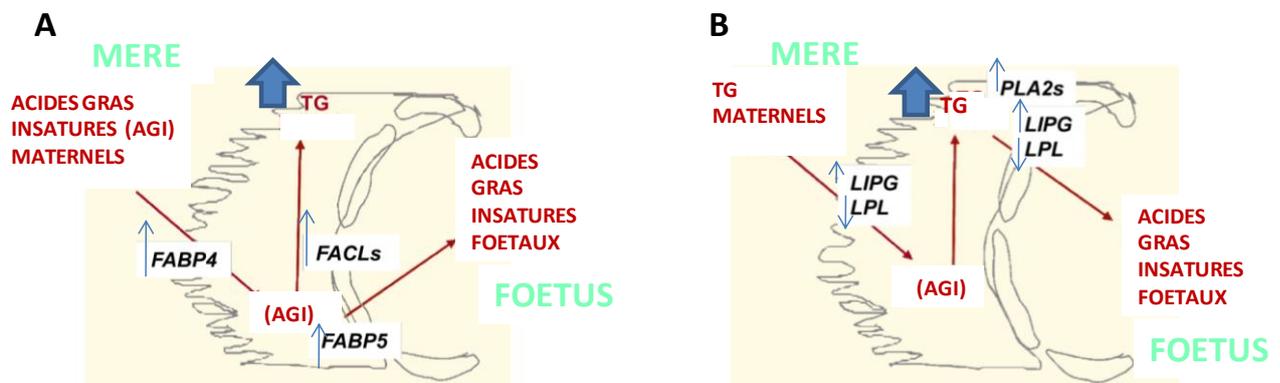


Figure 24 Modification des voies de synthèse des triglycérides (TG), du cholestérol et des phospholipides en cas de diabète maternel, d'après Radaelli T et al, 2009

L'accumulation de triglycérides placentaires représenterait une étape de régulation en réponse à l'excès du tissu adipeux fœtal. Le glucose ne jouerait qu'un rôle mineur dans cette accumulation de triglycérides à travers une synthèse d'acides gras *de novo* placentaire en absence d'acetyl-coenzyme-A (coA) carboxylase et acide-gras synthase dans le placenta. Par ailleurs, la voie de synthèse du cholestérol est stimulée à travers l'augmentation des Hydroxy-Méthyl-Glutaryl coA reductase (enzyme clé de la voie de la synthèse du cholestérol) et synthase en cas de DG (Radaelli T et al, 2009).

Le transport des lipides membranaires est perturbé (*Figures 25*). FABP4 et FABP5 sont deux isoformes de la FABP family assurant le transfert des lipides transplacentaires et leurs gènes sont surexprimés au niveau du placenta en cas de diabète maternel. La FABP4 importe les lipides vers le placenta et la FABP5 les exporte vers le fœtus, leur expression est augmentée en cas de diabète de type 1 et en cas de DG dans le placenta (Radaelli T et al, 2009). L'expression placentaire de FABP1 est augmentée dans le placenta issu de femmes diabétiques de type 1 et de femmes ayant présenté un DG dans une autre étude (Magnusson AL et al, 2004).

GENE	NOM DU GENE
PLA2G2	Phospholipase A2, group IIA
PLA2G5	Phospholipase A2, group V
FAT/CD36	Fatty acid translocase
FACL3	Fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3
FACL2	Fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 2
FACL4	Fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4
FABP5	Fatty acid binding protein 5
FABP4	Fatty acid binding protein 4
LIPG	Endothelial lipase
LPL	Lipoprotein lipase



Figures 25 A et B Modification des gènes impliqués dans le transport des lipides au niveau de la barrière en cas de diabète maternel, d'après Radaelli T et al, 2009

Les Fatty acylcoA ligases (FACLs) 2, 3, 4 qui catalysent la conversion des acides gras en esters d'acylcoA qui sont des précurseurs de la synthèse des triglycérides et du cholestérol sont aussi surexprimés dans le placenta de femmes atteintes de DG et de diabète prégestationnel de type 1. On signalera, tout de même que dans ce dernier, seule FACL3 est surexprimée. Les gènes de la lipase endothéliale (LIPG) et de la LPL qui hydrolysent les complexes lipidiques en acides gras libres avant qu'ils soient pris en charge par les cellules placentaires sont également surexprimés (Radaelli T et al, 2009). L'expression de la LPL placentaire est élevée (Magnusson AL et al, 2004) et corrélée au taux de TG dans le diabète maternel de type 1 (Lindegaard ML et al, 2006).

La Phospholipase A2 (PLA2) contribue à la mobilisation des phospholipides. Dans le diabète maternel, les phospholipides sont augmentés dans le placenta. Les phospholipides comme PLA2 sont impliqués dans la libération de médiateurs lipidiques de l'inflammation comme l'acide arachidonique, d'oméga-3 comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) et d'autres acides gras polyinsaturés. Dans le placenta de femmes diabétiques atteintes de DG donnant naissance à une macrosomie, l'expression des gènes des PLA2 des groupes II (PLA2G2), et V (PLA2G5) sont surexprimés, ce qui active la libération de l'acide arachidonique (Radaelli T et al, 2009). Les PLA2G2 et PLA2G5 sont les gènes qui codent pour la PLA2 de type II et de type V respectivement, impliquées dans la libération de médiateurs inflammatoires très athérogènes. La concentration placentaire des produits de l'hydrolyse de PLA2 comme les acides gras polyinsaturés tels le DHA est corrélée au poids fœtal et à l'expression des protéines de transfert des lipides placentaires FATP1 et FATP4 (Larque E et al, 2006).

Les prostaglandines placentaires sont aussi diminuées dans le diabète maternel. Elles seront détaillées dans le paragraphe de la régulation lipidique par les Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs).

C- AFFLUX D'ACIDES AMINÉS

1- Lors d'une grossesse physiologique

Le placenta possède plus de 20 transporteurs d'acides aminés différents, transportant les acides aminés vers le fœtus contre un gradient de concentration (Jansson T et al, 2001). La concentration en acides aminés du côté foetal est supérieure à celle du côté maternel (Lager S

et al, 2012). Les transporteurs des acides aminés sont regroupés en système A qui regroupe les SNATs 1; 2 et 4 et en système L qui regroupe LAT1 et 2 (Desforges M et al, 2009). SNAT1 est le principal transporteur d'acides aminés dans le placenta à terme (Novak D et al, 2006).

2- Dans le cadre d'un diabète maternel

A notre connaissance, il n'y a que très peu d'études étudiant l'impact direct du diabète sur les transporteurs d'acides aminés placentaires et en général, ils ne sont pas modifiés si le poids de naissance foetal est normal ou augmenté (Cisse O et al, 2013). Cetin *et al.* en 2005 font état d'échanges transplacentaires d'acides aminés altérés tels la glutamine dans le placenta issu de femmes atteintes de diabète gestationnel sans trouble de la croissance foetal mais avec une placentomégalie. Toutefois, ils n'ont pas étudié l'impact du diabète sur les transporteurs d'acides aminés (Cetin I et al, 2004).

Seul dans des cas de RCIU, à notre connaissance, l'activité des transporteurs d'acides aminés peuvent être modifiés dans le placenta, comme celle du système A est réduite, surtout dans des conditions d'hypoxie fœtale (Jansson T et al, 2002). Cependant, ces données n'ont pas été corrélées à la présence ou non d'un diabète maternel.

II- MÉCANISMES ADAPTATIFS AU SEIN DE L'UNITÉ PLACENTAIRE

A- MODIFICATIONS HORMONALES PLACENTAIRES

1- Dysrégulation de l'axe glucose-IGFs-insuline placentaire

a- Axe glucose-IGFs-insuline placentaire au cours d'une grossesse physiologique

Concernant l'insuline

L'insuline maternelle ne traverse pas la barrière hémato-placentaire et est produite par le pancréas fœtal dès 8 semaines de grossesse (Piper K et al, 2004). Chez le rongeur, le pancréas

endocrine ne devient fonctionnel qu'après la naissance (Symonds ME et al, 2009). L'insuline affecte le développement du placenta via des récepteurs à l'insuline au niveau du syncytiotrophoblaste. Au 1^{er} trimestre, le récepteur à l'insuline est surtout localisé dans le syncytiotrophoblaste en contact avec le sang maternel tandis qu'à terme, il se rapproche plus du côté fœtal, au niveau de la cellule endothéliale. Cette variation temporo-spatiale est parallèle aux niveaux et aux lieux de sécrétion de l'insuline maternelle puis fœtale (Hiden U et al, 2009).

Concernant le système des IGFs

Le système des IGFs est impliqué dans la régulation du développement de l'unité foeto-placentaire (*Figure 26*).

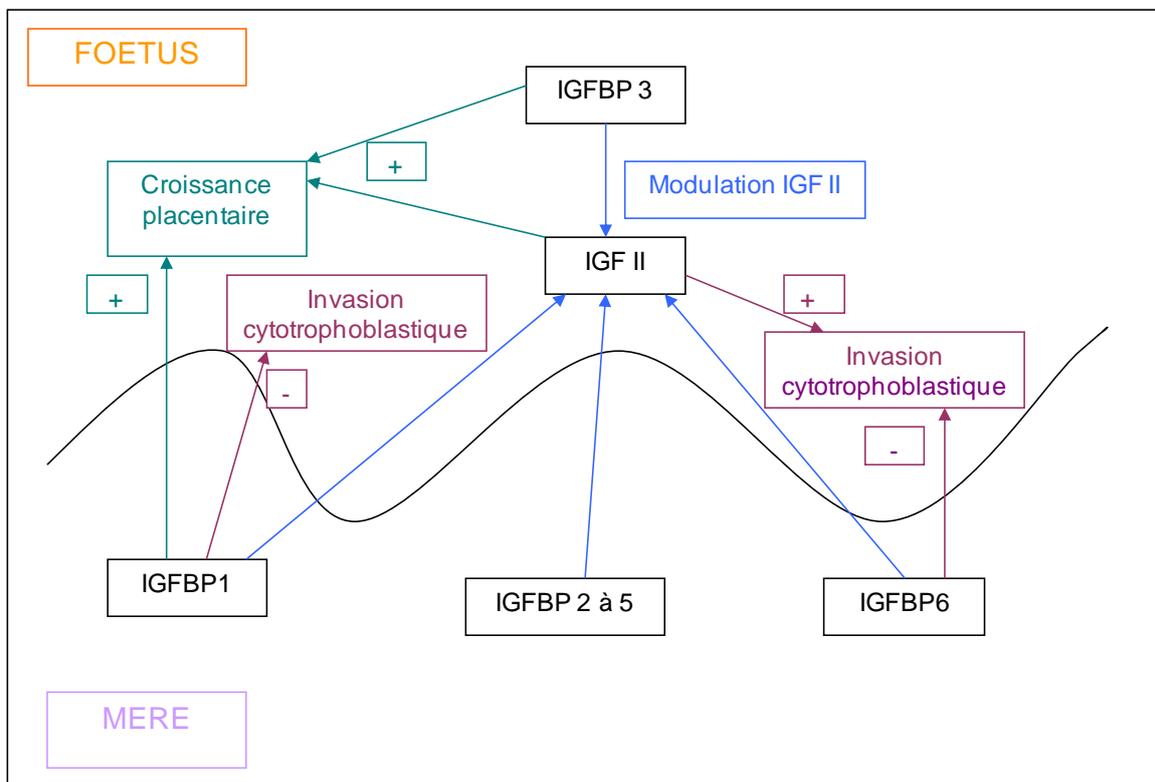


Figure 26 Implication des IGFs dans le développement placentaire, d'après Fajardy, 2009

L'IGF-1 et l'IGF-2 sont d'importants facteurs de croissance intervenant dans la croissance foeto-placentaire et tous deux exprimés dans le placenta. L'IGF-1 est exprimé à la fois dans le cytotrophoblaste et le syncytiotrophoblaste, tandis que l'IGF-2 n'est pas exprimé

dans le syncytiotrophoblaste (Han VK et al, 2000; Hills FA et al, 2004). L'IGF-2 est le facteur de croissance principal *in utero*. Il est exprimé surtout en début de grossesse et n'est plus retrouvé dans le placenta à terme. Il permet la croissance fœtale, la croissance placentaire, et agit sur le transfert des nutriments (Thomsen BM et al, 1997). Le placenta est surtout riche en récepteur de l'IGF-1 exprimé dans la membrane basale du syncytiotrophoblaste (Hills FA et al, 2004), ainsi il est plus facilement accessible pour l'IGF-1 et l'IGF-2 fœtales.

L'expression de l'insuline, de l'IGF-1, de l'IGF-2 et de leur récepteurs est régulée de façon tissu-spécifique et l'expression de ces gènes peut être affectée par les conditions nutritionnelles ou endocrines (Gicquel C et al, 2006). Chez l'Homme, une surexpression de l'IGF-2 active la croissance fœtale et donc la macrosomie (Monk K et al, 2006), tandis qu'une interruption ciblée de l'expression des gènes IGF-1, IGF-2 ou de leur récepteur contribuerait au RCIU (Smerieri A et al, 2011).

Les IGFBPs jouent aussi un rôle important. Des études chez la souris transgénique avec surexpression d'IGFBP1 induisent un RCIU (Watson JC et al, 2006). Ce sont des modulateurs clés. Les plus importants chez l'homme sont IGFBP1 à 4. Les cellules déciduales expriment les IGFBPs aux 2^{ème} et 3^{ème} trimestres (Denley A et al, 2005; Loukovaara S, 2000). L'IGFBP3 est exprimé au sein du placenta au niveau du trophoblaste extra-villeux (Han VK et al, 1996).

b- Dysrégulation dans le diabète maternel

Concernant l'insuline

L'Hormone Chorionique Gonadotrope (HCG) reflète la différenciation trophoblastique au sein du placenta. La production d'HCG est augmentée *in vitro* dans des conditions d'hyperglycémie (Suwaki H et al, 2007). Il n'y a pas beaucoup de données dans la littérature quant au rôle direct de l'insuline sur la placentation. L'insuline inhibe la production d'HCG placentaire lors du 1er trimestre de grossesse et *in fine* la différenciation trophoblastique, mais non à terme dans des extraits placentaires humains en culture (Barnea ER et al, 1993). Le récepteur de l'insuline change de conformation spatiale en cas de diabète maternel suggérant un changement dans la régulation placentaire des effets de l'insuline maternelle sur le fœtus (Hiden U et al, 2006).

Peu d'études décrivent un rôle direct de l'insuline dans le placenta. Elle stimule *in vitro* l'expression de la métalloprotéase (MMP) membranaire (MT1-MMP-1) lors du 1er trimestre de la grossesse, régulateur de la différenciation et de l'invasion trophoblastique (Hiden U et al, 2008). *In vivo*, chez des femmes diabétiques de type 1, on retrouve une corrélation positive entre l'expression génique de MT1-MMP-1 et le taux d'insuline (Hiden U et al, 2012). Selon les taux d'insulinémie maternelle et donc selon le type de diabète prégestationnel de type 1 ou de type 2, ou gestationnel, le degré de l'hyperglycémie maternelle, la réponse sur la différenciation, la prolifération trophoblastique peut être différente.

Un effet indirect de l'insuline, en cas d'hyperinsulinisme secondaire au diabète maternel est l'hypoxie fœtale. L'insuline, stimulant du métabolisme aérobie du glucose, augmente les besoins en oxygène du fœtus entraînant une hypoxie fœtale et placentaire. Cette hypoxie modifie l'expression de nombreux gènes comme l'Hypoxie Inducible Factor (HIF) et de facteurs proangiogéniques avec *in fine* une expansion de la surface d'échange placentaire contribuant en partie à la placentomégalie observée dans le diabète maternel (Li HP et al, 2013).

Concernant le système des IGFs

En ce qui concerne, le système des IGFs, la réponse est variable selon le type de diabète maternel. Dans la majorité des travaux, l'IGFBP3 placentaire est augmentée en cas de diabète de type 1 sans modification de l'expression d'IGF-1 placentaire. Dans le sang du cordon de femmes diabétiques de type 1, le taux de l'IGFBP3 est corrélée au taux de l'IGF-1 et du degré de macrosomie, l'IGFBP3 et l'IGF1 étant corrélés au poids fœtal (Loukovaara S et al, 2000). L'IGF1 et l'IGF2 affectent de nombreux processus impliqués dans l'invasion du trophoblaste et sont toutes les deux augmentées dans le placenta diabétique quelque soit le type de diabète (*Figure 27*).

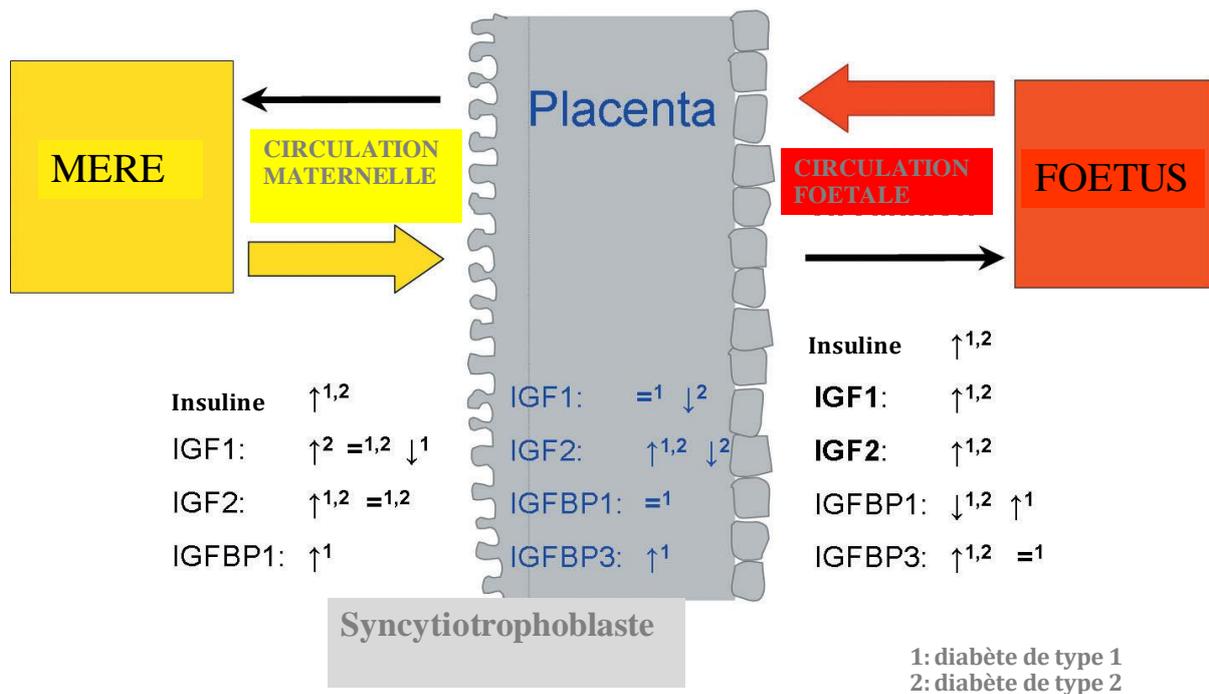


Figure 27 Axe glucose-insuline-IGFs placentaire dans le diabète maternel, d'après Hiden U et al, 2009

IGF: insulin-like growth factor; IGFBP: insulin-like growth factor binding protein

2- Dysrégulation de la production de la leptine placentaire

a- La leptine au sein de l'unité foeto-maternelle au cours d'une grossesse physiologique

D'abord mise en évidence au niveau des adipocytes du tissu adipeux blanc, il existe actuellement d'autres tissus la synthétisant comme les trophoblastes placentaires ou le muscle squelettique, la glande mammaire. La leptine est régulée par l'état nutritionnel, les glucocorticoïdes, l'œstradiol, l'HCG (Hardie L et al, 1997).

Chez l'Homme, la leptine est corrélée à l'adiposité. Pendant la gestation, le taux plasmatique de leptine augmente graduellement (Misra M et al, 2011). La grossesse est associée à une augmentation de 66% de la léptinémie maternelle et une augmentation de 9% de la masse grasse (Highman TJ et al, 1998). 93% de l'augmentation de la concentration de leptine a lieu pendant le tout début de la grossesse, au moment où la masse grasse diminue de 3%. La masse

grasse n'augmente que plus tard, associée à une faible augmentation de la léptinémie, suggérant une production de la leptine sur un site distinct du tissu adipeux qui prendrait le relais (Highman TJ et al, 1998). La chute immédiate des concentrations dans le post-partum, plaide en faveur d'une production placentaire (Hardie L et al, 1997). La leptinémie maternelle est corrélée avec l'IMC préconceptionnel. Toutefois, l'augmentation des concentrations de leptine est plus faible au cours de la grossesse en cas d'obésité préconceptionnelle (Hardie L et al, 1997).

Contrairement à la leptinémie maternelle, l'expression placentaire diminue tout au long de la grossesse. Il semblerait que la leptinémie placentaire ne reflète la production de leptine placentaire qu'en tout début de grossesse. Le taux de leptine est 50 fois plus élevé dans les villosités chorales du 1er trimestre qu'à terme (Chardonnes D et al, 1999). La leptine est exprimée dans les cellules cytotrophoblastiques et syncytiotrophoblastiques, ainsi qu'au niveau des capillaires fœtaux au niveau de leur cellules endothéliales, ce qui suggère une sécrétion de leptine placentaire à la fois dans les circulations maternelle et fœtale (Ashworth CJ et al, 2000). Dans des études *in vitro*, 95 % de la leptine placentaire est libérée dans la circulation maternelle (Linnemann K et al, 2000). La leptine a une structure identique à celle du tissu adipeux mais avec un promoteur spécifique suggérant une régulation différente (Masuzaki H et al, 1997). Outre sa production placentaire, elle est aussi synthétisée par les membranes fœtales, les cellules de l'amnios. La léptinémie fœtale n'est pas corrélée à la production placentaire (Akerman F et al, 2002) mais il existe une corrélation positive entre la leptine, l'insuline, l'IGF-1 et le poids foetal (Maffeis C et al, 1999).

Outre sa capacité à synthétiser la leptine, le placenta exprime aussi dans le syncytiotrophoblaste les récepteurs OB-RL et OB-RS à la leptine, respectivement forme longue et courte des récepteurs (Smth JT et al, 2002). L'expression des récepteurs varie selon les espèces. Chez le rat, OB-RS augmente sa production placentaire tout au long de la grossesse (Smth JT et al, 2002), tandis qu'il n'y a pas de variation d'expression chez l'Homme (Henson MC et al, 1998). La leptine active la voie des MAPK via son récepteur OB-RL et dans une moindre mesure via OB-RS qui forme une cascade de signalisations activée entre autres par certaines cytokines comme le TNF alpha (Fruhbeck G et al, 2006).

La leptine placentaire a des capacités prolifératives et anti-apoptotiques sur les cellules trophoblastiques. Elle stimule de plus l'angiogénèse placentaire, participe au remodelage des artères spiralées et l'invasion trophoblastique en augmentant MMP-2 et MMP-9 (Castelluci M

et al, 2000). La leptine induit la prolifération des cellules trophoblastiques, stimule la synthèse protéique et de cytokines par les cytotrophoblastes (Perez-Perez A et al, 2010).

b- Dysrégulation de la leptine placentaire dans le diabète maternel

La production de leptine est augmentée dans le diabète maternel à l'origine d'une hyperleptinémie maternelle (Qiu C et al, 2004). En cas de diabète de type 1, les concentrations ombilicales de leptine sont augmentées avec corrélation positive avec la macrosomie. De manière intéressante, dans une étude très récente, est fait état d'une corrélation positive entre le poids fœtal et l'expression placentaire de la leptine en cas de diabète prégestationnel de type 1 (Iciek R et al, 2013). Le "cross-talk" placentaire entre l'insuline et la leptine dans les voies de signalisation est un facteur majeur dans les changements placentaires induits du diabète (Gross GA et al, 1998).

Elle favorise en cas de diabète la survie des cytotrophoblastes (Magarinos MP et al, 2007). La leptine augmenterait ainsi la production d'HCG, connue pour favoriser la différenciation trophoblastique (Ning Y et al, 2004). Elle stimulerait l'utilisation d'acides aminés et augmenterait la synthèse des protéines de la matrice extra cellulaire et des métalloprotéases. L'hyperglycémie maternelle diminue l'épaisseur de la membrane basale du trophoblaste en réduisant les apports en oxygène. La leptine en cas de diabète participe aussi à cette diminution et à la synthèse de collagène de la matrice extracellulaire (Magarinos MP et al, 2007). L'expression placentaire de la leptine est augmentée en cas d'hypermécanisation placentaire, (Castelluci M et al, 2000).

B- MODIFICATIONS DES MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION ET DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

1- Modifications des médiateurs de l'inflammation

a- La réponse inflammatoire au cours de la grossesse physiologique

La grossesse normale s'accompagne d'une activation modérée de la réponse inflammatoire (Bowen JM et al, 2002).

b- La réponse inflammatoire dans le diabète maternel

On observe dans le diabète maternel, une surexpression placentaire d'un grand nombre de molécules pro-inflammatoires comme le Tumor-Necrosis-Factor (TNF)-alpha, le Tumor Growth factor (TGF)-bêta ou l'interleukine-6 (IL6). L'augmentation des cytokines placentaires, notamment le TNF-alpha, inhibe l'invasion trophoblastique dans un modèle de souris gestante diabétique. Dans cette étude, le taux de TNF-alpha est corrélé avec le degré d'invasion trophoblastique et le taux d'avortements précoces (Bobadilla RA et al, 2010). Le TNF-alpha limite les capacités d'invasion des cytotrophoblastes au 1^{er} trimestre et stimule l'apoptose dans les cytotrophoblastes à terme. L'augmentation du TNF alpha induit une insulino-résistance maternelle nécessaire à la poursuite de la grossesse dans la grossesse diabétique (Kirwan JP et al, 2002; Radaelli T et al, 2003).

2- Modifications des médiateurs de la réponse immunitaire

a- La réponse immunitaire au cours de la grossesse physiologique

Les macrophages fœtaux placentaires, les cellules de HofBauer, sont présentes au sein de la villosité chorale dès les tous premiers stades de développement et ce jusqu'au terme (Demir R et al, 1984). Ils ont un profil anti-inflammatoire (classés M2) (Joerink M et al, 2011). Leur rôle dans le maintien du système immunitaire placentaire est crucial; ils régulent l'immunosuppression de certaines molécules anti-inflammatoires (Tang Z et al, 2011). Ces cellules de HofBauer sont impliquées dans la phagocytose, le transfert de protéines sériques et le remodelage tissulaire (Underhill DM et al, 2012). Il semblerait qu'elles soient impliquées dans les processus de maturation placentaire et qu'une altération du nombre de ces cellules aboutirait à des complications gravidiques comme la villite, d'étiologie inconnue (Tang Z et al, 2011).

b- Modifications de la réponse immunitaire dans le diabète maternel

Les macrophages, dans un environnement hyperglycémique libèrent des cytokines pro-inflammatoires avec *in fine* l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire comme le nuclear factor-kappa B (NF-kB) chez la souris (Wen Y et al, 2006). Dans une étude très récente de notre équipe, le diabète maternel

pouvait créer un déséquilibre du phénotype des macrophages placentaires, autrement dit entre les macrophages anti- et les pro-inflammatoires. Les cellules de HofBauer, de type M2, anti-inflammatoires avaient acquis un phénotype M1, proinflammatoire à la fois chez l'Homme et le rat *in vitro* et *in vivo*. De plus, dans les mêmes conditions, les voies de signalisation pro- et anti-inflammatoires étaient modifiées avec activation de la voie du NF-kB et du stress oxydatif. La production de Nitric Oxyde (NO) était également accrue avec augmentation de l'expression génique de la NO syntase endothéliale (eNOS) 2 (Sisino G et al, 2013). Le NO est produit par des eNOS et agit en tant que second messenger, il intervient dans la régulation des flux sanguins placentaires, la différenciation et l'invasion trophoblastique ainsi que dans l'angiogénèse placentaire (Thaler CD et al, 2003; Yang ZZ et al, 2003).

3- Stress oxydatif

Le diabète maternel est associé à un stress oxydatif qui a des répercussions sur le développement *in utero* du fœtus. En effet, les mères diabétiques quelque soit le type de diabète (type 1 ou gestationnel) en cours de grossesse présentent des niveaux d'enzymes antioxydantes comme la superoxide dismutase (SOD), la glutathione peroxidase (GPX) et la catalase (CAT) réduits par rapport aux mères non diabétiques. Une supplémentation exogène d'enzymes antioxydantes ou un meilleur équilibre glycémique réduit sensiblement le stress oxydatif (Peuchant E et al, 2004). Le stress oxydatif provoque chez le fœtus un RCIU voir une mort *in utero* (Sivan E et al, 1996).

C- MODIFICATIONS DE L'ANGIOGÉNÈSE PLACENTAIRE

Les modifications de l'angiogénèse sont différentes selon le degré de l'hyperglycémie, du type de diabète et des complications gravidiques tant sur le plan moléculaire que morphologique et variables dans la littérature. Leur mécanisme est complexe et fait intervenir à la fois le système hormonal placentaire, les facteurs de croissance, les molécules pro-inflammatoire, les facteurs angiogéniques. Ainsi la balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques peut être différente.

Selon les cas, dans le diabète maternel, l'expression des gènes des facteurs proangiogéniques placentaires comme ceux du VEGF et PIGF placentaires sont augmentés, ou

diminués (Kolluru GK et al, 2012). Ces facteurs proangiogéniques sont des régulateurs de l'invasion trophoblastique qu'ils accélèrent *in vivo* et *in vitro* chez l'Homme et le rat (Brouillet S et al, 2010). Le diabète maternel, notamment de type 1 est associé à l'augmentation placentaire d'un autre acteur proangiogénique, le FGF-2 qui stimule l'angiogénèse (Arany E et al, 1998).

Quand la balance est en faveur des facteurs proangiogéniques, le placenta devient hypervasculaire avec augmentation de la surface d'échange qui va contribuer à faciliter la diffusion de l'oxygène (Jauniaux E et al, 2006). Elle est la résultante de l'augmentation de l'expression de l'IGF-2, de la leptine, de l'IGF1, de la réduction du TNF-alpha, de l'hypoxie fœtale. De ce fait, du point de vue histologique, on note des villosités immatures, une infiltration de l'espace endothélial par des macrophages traduisant un état inflammatoire. Le réseau capillaire vasculaire des capillaires est augmenté et anarchique. La surface de diffusion villositaire est particulièrement augmentée due à une réduction de l'épaisseur de la membrane basale du trophoblaste. La surface des capillaires est augmentée avec un diamètre des capillaires élargi (Jirkowska M et al, 2012). Cette hypervascularisation placentaire contribuera à un excès de croissance fœtale et *in fine* une macrosomie. Cependant les anomalies sont plus marquées en cas de diabète pré-gestationnel de type 1 que dans le DG, avec notamment des défauts plus marqués de l'invasion trophoblastique et de la maturation villositaire suggérant un rôle de hyperglycémie avant le stade de l'implantation.

Au contraire, lorsque le diabète est associé à une complication vasculaire comme la prééclampsie, la balance est en faveur des facteurs antiangiogéniques avec baisse de l'expression du VEGF et du PIGF placentaires, créant un milieu antiangiogénique qui va favoriser l'insuffisance placentaire avec défaut du remodelage des artères spiralées et *in fine* le RCIU (Uddin MN et al, 2013). Du point de vue histologique, le réseau capillaire est diminué avec des surfaces d'échange diminuées. Les espaces intervillositaires sont plus larges. Le diamètre des capillaires beaucoup plus petit. Le placenta est plutôt hypovasculaire (Jirkowska M et al, 2012).

La difficulté sur le plan histologique, est que, souvent, au sein d'un même placenta que ce soit chez l'Homme ou le rongeur, la vascularisation est hétérogène avec parfois des zones à la fois hypervasculaires et hypovasculaires, surtout chez l'Homme (Jauniaux E et al, 2006; Jirkowska M et al, 2012). Les études histologiques du placenta du rat diabétique sont très peu nombreuses dans la littérature.

D- MODIFICATIONS DES ÉCHANGES EN OXYGÈNE

La surface d'échange foeto-placentaire est élargie en cas de diabète maternel due à une hypervascularisation placentaire. Les mécanismes restent encore imprécis mais on ne peut exclure le rôle de l'hyperglycémie et de l'insuline. L'insuline, stimule le métabolisme aérobie du glucose, augmente les besoins en oxygène du fœtus entraînant une hypoxie fœtale et placentaire (Li HP et al, 2013). La diminution en oxygène est responsable d'une augmentation de l'expression de facteurs proangiogéniques comme le VEGF, qui seront responsables d'une prolifération de cellules endothéliales et d'une hypervascularisation placentaire.

E- MODIFICATION DE LA RÉGULATION PLACENTAIRE PAR LES PPARs

I- Rôle des PPARs dans le placenta

a- Les récepteurs peroxisome proliferator-activated (PPARs)

Les PPARs sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires aux hormones. Ils vont transformer en réponse cellulaire des signaux de l'environnement, qu'ils soient nutritionnels ou inflammatoires et sont des régulateurs clés de l'homéostasie lipidique et des processus anti-inflammatoires (Beaven SW et al, 2006; Desvergne B et al, 2004). Il existe 3 isoformes de PPARs qui sont les PPAR alpha, PPAR gamma et PPAR delta. Les PPARs sont activés en s'hétérodimérisant avec le récepteur nucléaire, Retinoid Acid Receptor (RXR). Chaque isoforme présente une distribution tissulaire, une fonction physiologique et un ligand spécifiques (Hihi AK et al., 2002) (*Figure 28*).

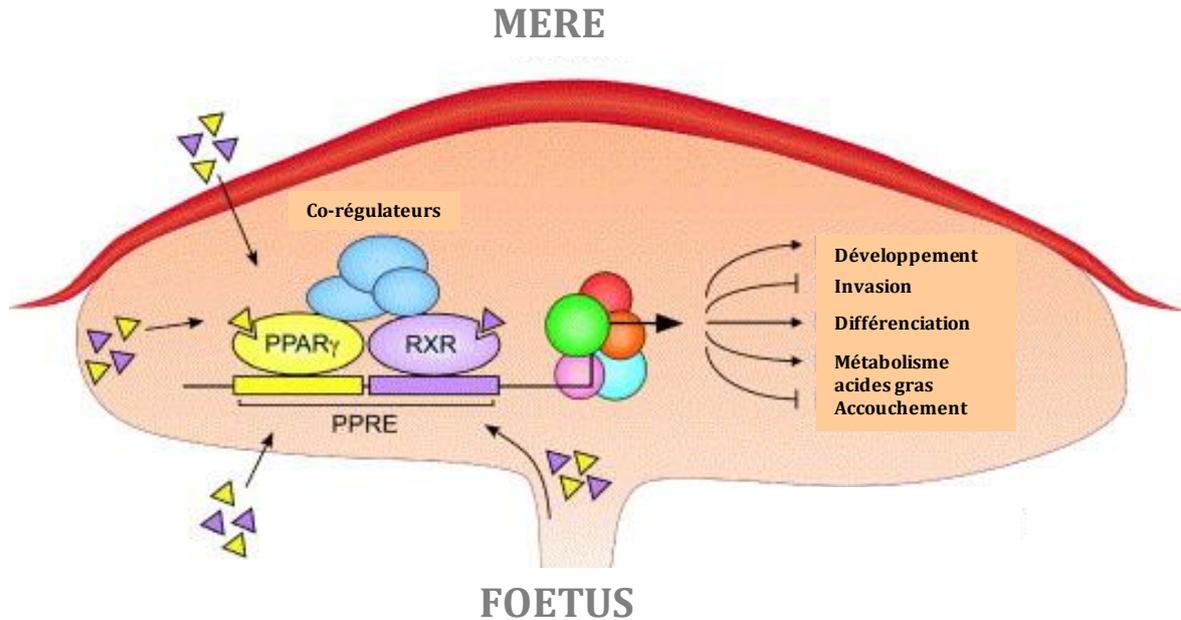


Figure 28 Implication des PPARs dans le placenta, d'après Schaiff WT et al, 2006
 RXR: retinoid acid receptor; PPRE: Elément de réponse du promoteur du PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)

b- Rôle dans la régulation du métabolisme lipidique et de l'inflammation placentaires

Le placenta assure le transfert des lipides de la mère au fœtus en régulant leur transport et leur métabolisme (Herrera E et al, 2006). Il est doté de plusieurs protéines de transport et possède toutes les enzymes nécessaires pour utiliser, accumuler et diriger les lipides dans la circulation fœtale (Duttaroy AK et al, 2004; Haggarty P et al, 2002). Bien que les mécanismes qui régulent le métabolisme des lipides dans le placenta sont largement inconnus, des études récentes suggèrent que les récepteurs peroxisome proliferator-activated (PPARs) peuvent être impliqués dans ces voies de régulation (Xu Y et al, 2007).

Les PPARs gamma contrôlent au niveau du trophoblaste l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (Nadra K et al, 2006). Les ligands endogènes du récepteur PPAR gamma sont des acides gras monoinsaturés comme l'acide oléique ou polyinsaturés comme l'acide linoléique, précurseur de l'acide arachidonique, des prostaglandines comme la 15Deoxy Δ 12,14 ProstaglandinJ2 (15dPGJ2) (Barlic J et al, 2007).

Ils sont exprimés dans le tissu adipeux, impliqués dans la différenciation adipocytaire et dans la sensibilité à l'insuline qu'ils augmentent (Lee CH et al, 2003). Ils augmentent l'absorption des acides gras et l'expression des lipoprotéines dans les trophoblastes en culture (Schaiff WT et al, 2007). Chez le rat, la 15dPGJ2 module la synthèse *de novo* des lipides dans le placenta à travers l'activation des PPARs gamma (Capobianco E et al, 2005). Plusieurs études ont montré que 15dPGJ2 a des propriétés importantes dans la régulation de l'homéostasie lipidique et des processus anti-inflammatoires via l'activation des PPARs dans différents tissus (Jawerbaum A et al, 2005). En effet, des études réalisées dans les tissus placentaires humains et de rat ont montré la capacité de 15dPGJ2 à contrôler la formation de médiateurs pro-inflammatoires. En outre, dans les trophoblastes placentaires humains, 15dPGJ2 régule la différenciation trophoblastique (Fournier T et al, 2007).

Ils jouent également un rôle anti-inflammatoire en inhibant l'expression de protéines placentaires de l'inflammation, comme TNF-alpha, dans les macrophages (Li MY et al, 2006).

c- Rôle dans la placentation

Au cours de la grossesse, les PPARs gamma vont se révéler être essentiels à la placentation ainsi qu'au bon fonctionnement du placenta et de l'accouchement (Fournier T et al, 2007).

Chez l'Homme, durant le 1er trimestre, les PPARs gamma sont détectés dans le cytotrophoblaste villositaire puis au niveau du trophoblaste extra-villositaire dès 7 semaines de gestation (Wang Q et al, 2002). Au 2ème trimestre, on les retrouve dans les colonnes cytotrophoblastiques des villosités crampon (Waite LL et al, 2000). Par contre, on ne les détecte pas dans le syncytiotrophoblaste aux 1er et 2ème trimestres (Capparuccia L et al, 2002) mais au 3ème trimestre où ils sont également présents dans le trophoblaste extra-villositaire (Schaiff WT et al, 2000).

Chez le rongeur, les PPARs gamma sont exprimés dès E11.5 chez la souris avec un pic d'expression à E14.5 puis une diminution jusqu'au terme. On les retrouve dans le spongiotrophoblaste et dans le labyrinthe (Suwaki M et al, 2006). Des souris invalidées pour le gène du PPAR gamma, exhibent des malformations labyrinthiques avec absence de différenciation des cellules du trophoblaste et un spongiotrophoblaste qui phagocyte

anormalement les hématies. Parallèlement, le déficit en PPAR gamma est létal pour ses embryons à E10 du fait de l'insuffisance placentaire à ce stade de switch du placenta chorio-vitellin vers le placenta chorio-allantoïdien (Barak Y et al, 1999). A ce stade de développement, l'expression du PPAR gamma placentaire est élevée (Ain R et al, 2006). Parallèlement, à ces observations, une absence de son partenaire, le retinoid acid receptor (RXR), cofacteur du PPAR gamma, conduit également à une létalité embryonnaire avec des anomalies de formation du labyrinthe et du spongiotrophoblaste. Les embryons survivants dans cette étude présentaient un RCIU (Sapin V et al, 1997).

Ils sont donc des facteurs de transcription essentiels à la placentation chez la souris et chez l'Homme notamment dans leur rôle de régulateurs de l'invasion, de la migration, de la différenciation trophoblastique ainsi que de la formation du syncytiotrophoblaste qu'ils accélèrent (Fournier T et al, 2007; Schaiff WT et al, 2006).

2- Modifications de régulation par les PPARs placentaires dans le diabète maternel

a- Modifications du métabolisme lipidique via les PPARs

Le diabète maternel conduit à des anomalies du métabolisme lipidique placentaire avec une accumulation lipidique dans le placenta concernant à la fois les acides gras et les triglycérides comme nous avons vu précédemment (Catalano PM et al, 2001). Les PPARs gamma pourraient être impliqués dans ces altérations lipidiques placentaires.

Bien que la production de l'acide arachidonique et de son métabolisme est augmenté dans le placenta de femmes diabétique de type 1 (Kuhn DC et al, 1990), les métabolites qui en résultent sont altérés avec augmentation du ratio thromboxane A / prostaglandines (White V et al, 2002). La prostaglandine 15dPGJ2, issu du métabolisme de l'acide arachidonique, est un ligand naturel agoniste des PPARs, notamment PPAR gamma et PPAR bêta/delta. Elle a un rôle de régulation dans le métabolisme lipidique entre autres en inhibant les voies de la synthèse lipidique de *novo*. Chez la rate gestante avec diabète induit par la STZ, la concentration de 15dPGJ2, est retrouvée diminuée dans le placenta à E13.5 et à terme que ce soit *in vivo* et *in vitro* (Capobianco E et al, 2005; Capobianco E et al 2008). Cette diminution de la 15dPGJ2 a

également été constatée chez l'Homme, notamment dans le placenta issu de femmes diabétique de type 1 ou ayant présenté un DG à terme avec une corrélation négative entre la concentration de 15dPGJ2 et le degré d'hyperglycémie (Jawerbaum A et al, 2004). La diminution de la 15dPGJ2 en cas de diabète maternel induirait une activation de cette voie anabolique de synthèse lipidique *de novo* placentaire avec *in fine* une accumulation lipidique dans le placenta. Toutefois, cette accumulation lipidique est également induite par un afflux lipidique en excès provenant de la circulation maternelle. Il semblerait que cette régulation de la 15dPGJ2 est PPAR gamma dépendante et indépendante (Capobianco et al, 2008; Jawerbaum A et al, 2004). La prostaglandine E2 (PGE2) a également été retrouvée diminuée dans le placenta diabétique, via PPAR delta (Higa R et al, 2007).

Les PPARs contribueraient donc dans le diabète maternel à participer à cette accumulation de lipides par inhibition de la production de prostaglandines tels PGE2 ou 15dPGJ2.

b- Modifications des médiateurs de l'inflammation via les PPARs

Les prostaglandines, par leur rôle anti-inflammatoire, sont également connues pour réguler la production du NO en l'inhibant (Jawerbaum A et al, 2004). De ce fait, dans le placenta diabétique chez le rat et chez l'Homme, la production de NO est sans surprise retrouvée élevée (puisque les prostaglandines sont basses) induisant un stress oxydatif placentaire. Cette régulation de la production de NO fait intervenir une régulation via les PPARs placentaires (Capobianco E et al, 2008; Jawerbaum A et al, 2004). Les PPARs contribueraient donc à participer au stress oxydatif.

c- Modifications de la placentation via les PPARs

L'invasion trophoblastique est médiée par des facteurs trophoblastiques par voie paracrine et par des facteurs utérins par voie autocrine. La dégradation de la matrice extracellulaire dépend de l'expression et de la sécrétion d'enzymes spécifiques, comme les métalloprotéases (MMPs).

Les MMPs sont impliquées dans le processus d'invasion trophoblastique (Borbely AU et al, 2014). Parmi les MMPs placentaires impliquées, MMP-9 et MMP-2 régulent l'invasion des cellules trophoblastiques vers la muqueuse utérine. Le pouvoir invasif des trophoblastes est limité dans le temps et dans l'espace et il peut être régulé par des facteurs autocrines ou paracrines. Il a déjà été suggéré que le TNF-alpha placentaire, facteur de l'inflammation, peut être un des facteurs de croissance impliqué dans la prolifération des cellules trophoblastiques (Yang Y et al, 1993). Il est suggéré que le TNF-alpha induit la sécrétion de MMP-9 par les éosinophiles via une voie p38 MAPK (Cohen M et al, 2006), que l'urokinase plasminogen activator (uPA) cytotrophoblastique et décidual est impliqué dans la migration des cellules trophoblastiques (Chapman et al, 1997) et que le plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) cytotrophoblastique assure la stabilité de l'interface foeto-maternelle (Feng Q et al, 2000).

L'hyperglycémie maternelle altère le profil invasif et prolifératif des cytotrophoblastes lors du 1er trimestre chez l'Homme (Uddin MN et al, 2013). Suwaki et al ont suggéré que la voie des PPARs gamma est impliquée dans l'insuffisance placentaire induite par l'hyperglycémie. L'expression placentaire des PPARs gamma est retrouvée augmentée chez les souris diabétiques comparées à des souris contrôles de E11.5 jusqu'au terme (Suwaki N et al, 2007). Une étude à notre connaissance fait état de données différentes avec diminution de l'expression placentaire des PPARs gamma dans le placenta diabétique, mais dans des conditions d'hyperglycémie maternelle différentes, plus modérées (Jawerbaum A et al, 2004). Il semble donc que le degré d'hyperglycémie maternelle, autrement dit la sévérité du diabète maternel influence cette expression mais le mécanisme exact reste à être précisé.

L'Hormone chorionique gonadotrope (HCG) reflète la différenciation trophoblastique au sein du placenta. La production d'HCG est augmentée *in vitro* dans des conditions d'hyperglycémie (Suwaki N et al, 2007). L'hyperglycémie accélère la différenciation du trophoblaste au détriment de la prolifération cytotrophoblastique (Hinck L et al, 2003). Les PPARs gamma accélèrent la différenciation du cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste qui devient beaucoup plus résistant à un environnement hypoxique en augmentant la production d'HCG (Shalom-Barak T et al. 2012).

Ainsi l'hyperglycémie maternelle (*Figure 26*) peut altérer les cellules cytotrophoblastiques, induire un stress oxydatif en activant la voie p38 MAPK et les PPARs gamma avec pour conséquence une hypoxie placentaire, une dysfonction endothéliale et *in*

fine une insuffisance placentaire. L'activation de la voie p38 MAPK induit une diminution en parallèle de l'uPA, du PAI-1 et donc de la MMP-9. La diminution de la MMP-9 va altérer la migration et l'invasion trophoblastique avec *in fine* une placentation anormale, une diminution de remodelage des artères spiralées et une possible hypoxie placentaire. Récemment, il a été évoqué que l'hyperglycémie serait responsable de la création d'un milieu anti-angiogénique au 1er trimestre de grossesse au sein des cellules cytotrophoblastiques avec diminution des facteurs proangiogéniques comme le vascular endothelial growth factor (VEGF) ou le placental growth factor (PIGF) qui peuvent aussi participer à l'hypoxie placentaire éventuelle (Uddin MN et al, 2013) (Figure 29).

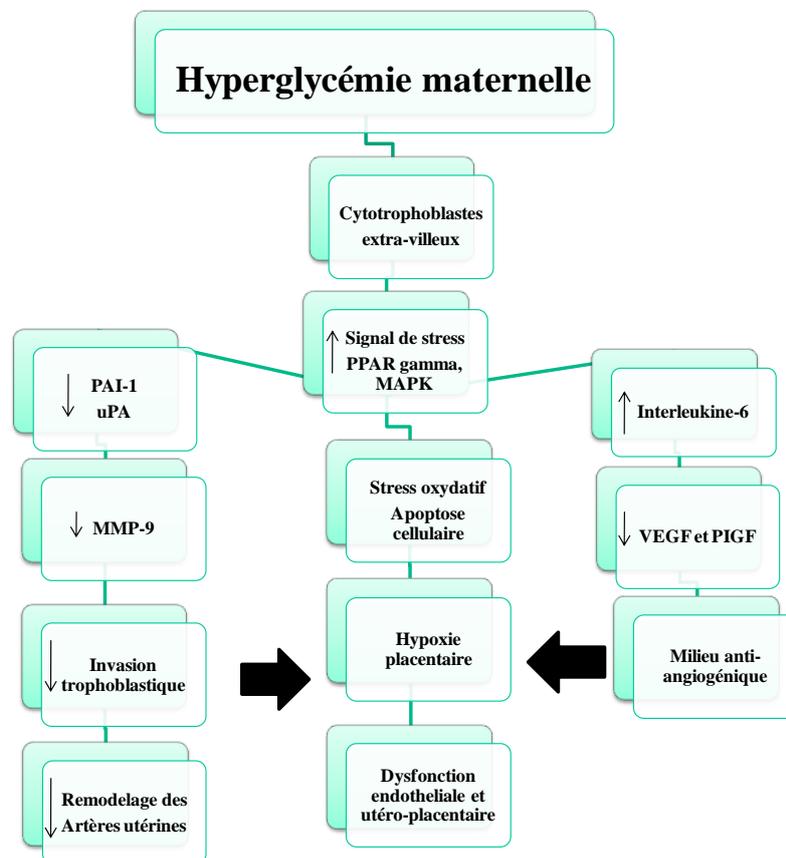


Figure 29 Hypothèse mécanistique de dysfonction placentaire induite par l'hyperglycémie, d'après Uddin MN et al, 2013

uPA: urokinase plasminogen activator; (PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1); MMP-9: métalloprotéase 9; VEGF: vascular endothelial growth factor; PIGF: placental growth factor; PPAR: r peroxisome proliferator-activated receptor

Un traitement par des agonistes des PPARs gamma, rosiglitazone ou pioglitazone, chez un modèle de rat diabétique réduirait le stress oxydatif et l'activation de la p38MAPK chez le rat (Collino M et al, 2006). Les PPARs accélèrent donc la différenciation du cytotrophoblaste et participe au défaut d'invasion trophoblastique.

III- MÉCANISMES ADAPTATIFS AU SEIN DE L'UNITÉ FŒTALE

Le fœtus doit donc s'adapter à son environnement foeto-placentaire notamment en cas de situation d'hyperglycémie. Il devra adapter sa croissance avec par conséquent la possibilité de développer soit une macrosomie soit plus rarement un RCIU en cas de complications vasculaires associées ou en cas de complications microangiopathiques associées au diabète.

A- LA MACROSOMIE

La physiopathologie de la macrosomie fœtale dans le diabète maternel reste encore mal connue. Elle dépend de l'apport en nutriments, du statut endocrinien (hormones, facteurs de croissance) fœtal et maternel, de la qualité de leur transfert placentaire, et de la réponse fœtale et placentaire à cet environnement diabétique (Fajardy I et al, 2009).

Un des mécanismes classiquement décrit expliquant cette macrosomie est l'hyperinsulinisme fœtal compensatoire de l'hyperglycémie chronique maternelle (Langer O et al, 1988). L'insuline ayant un rôle anabolique va entraîner une croissance fœtale accélérée avec excès de masse grasse. Toutefois, on signalera 30% de cas de macrosomie malgré un bon contrôle glycémique issus de femmes diabétiques de type 1 (Lepercq J et al, 2001), l'hyperinsulinisme n'étant probablement pas le seul responsable de cette augmentation de croissance.

Knopp et al évoquaient déjà dans les années 80 que le poids de naissance des enfants nés de mères diabétique, était mieux corrélé au taux de triglycérides maternels et d'acides gras circulants qu'aux taux de glycémie maternelle (Knopp RH et al, 1986). Ainsi, l'accroissement du transport lipidique placentaire par le biais d'une accumulation de lipides placentaires et du stockage accru des acides gras, contribuent à l'accroissement du poids foetal.

De manière intéressante, il a été retrouvé dans une étude récente, une surexpression de la LPL-1 placentaire en cas de macrosomie fœtale chez des rates traitées 1 semaine avant la mise à mâle par traitement combiné associant nicotinamide et streptozotocine (NCT- STZ), intolérantes au glucose sans être diabétiques (Cisse O et al, 2013). Toutefois, dans cette même étude, l'expression de la LPL-1 n'était pas modifiée si le poids fœtal était normal malgré l'intolérance au glucose maternelle. Il semble donc que ce la LPL-1 puisse être un marqueur de la dysrégulation pondérale fœtale et de l'accélération du transfert placentaire d'acides gras vers le fœtus en cas d'intolérance au glucose maternelle.

B- LE RCIU

Le RCIU peut être la conséquence d'une insuffisance placentaire liée à un défaut de vascularisation. La vasodilatation des artères spiralées utérines est insuffisante (*Figure 30*).

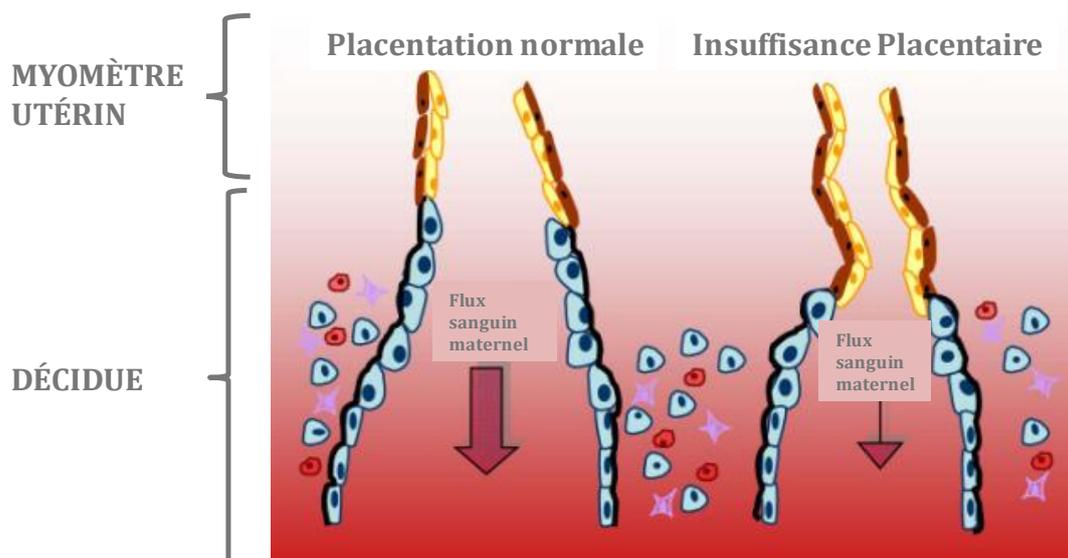


Figure 30 Remodelage des artères spiralées utérines insuffisant, d'après Lunghi L et al, 2007

La croissance fœtale est surtout régulée par les apports nutritionnels au fœtus. Elle est donc tributaire du placenta qui assure les échanges entre la mère et l'enfant. Pendant la croissance fœtale normale, comme nous avons vu, les cellules du cytotrophoblaste envahissent la muqueuse utérine, avec remodelage des artères utérines. Un défaut d'invasion

cytotrophoblastique aboutit à un défaut du remodelage des artères spiralées et donc à des modifications des flux sanguins maternels et *in fine* à un défaut d'apport de nutriments, d'oxygène entre autres au fœtus qui peut aboutir à un RCIU (Lunghi L et al, 2007).

Le bon fonctionnement du placenta dépend donc de l'intégrité du syncytiotrophoblaste et de la circulation maternelle dans la chambre intervillieuse. Le syncytiotrophoblaste est en contact direct avec le sang maternel, donc avec l'environnement intra-utérin. Si l'environnement intra-utérin est modifié comme dans le cas du diabète maternel associé à une complication vasculaire ou à une complication microangiopathique, le transfert de glucose, d'acides aminés, de triglycérides et d'acides gras non estérifiés à travers le placenta vers le fœtus peut être diminué. Le transfert des nutriments au fœtus fait alors défaut et la croissance est ralentie.

POINTS-CLÉS

- L'environnement diabétique intra-utérin affecte l'unité foeto-placentaire
- L'unité foeto-placentaire doit s'adapter face à un afflux de nutriments (glucose, acides aminés, lipides) en excès
- En cas de diabète maternel, le placenta met en place des mécanismes adaptatifs hormonaux, inflammatoires, immunitaires
- En cas de diabète maternel, les PPARs interviennent dans la placentation, dans les modifications des médiateurs de l'inflammation et dans le métabolisme lipidique.
- Les conséquences de ces mécanismes adaptatifs sont une modification des transferts, de la réponse immunitaire, et de l'angiogénèse associé à un stress oxydatif.
- Ces mécanismes adaptatifs placentaires auront des conséquences en clinique avec comme conséquence des anomalies de croissance, à savoir une macrosomie ou un RCIU

OBJECTIFS

Malgré l'amélioration des prises en charge diabétologiques et obstétricales, la grossesse chez la patiente ayant un diabète pré-gestationnel ou gestationnel reste donc à ce jour à haut risque pour la mère et pour l'enfant. Chez l'enfant, les anomalies de croissance restent, à ce jour, très fréquentes avec des conséquences à court et à long terme. La croissance fœtale est un processus complexe mettant en jeu la susceptibilité génétique fœtale mais surtout le milieu intra-utérin à savoir l'environnement métabolique maternel et placentaire.

Nous avons vu que le placenta, à l'interface entre la mère et le fœtus, acteur crucial de la programmation fœtale, va s'adapter à son environnement afin de permettre la survie fœtale. C'est le cas dans le diabète maternel au prix le plus souvent d'un trouble de la croissance intra-utérine (macrosomie ou RCIU). Les mécanismes physiopathologiques en lien avec ces anomalies de croissance dans ce contexte de diabète maternel restent encore incompris et mal expliqués par l'hyperglycémie maternelle seule.

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le compartiment placentaire en analysant l'expression des gènes impliqués dans la croissance foeto-placentaire afin de déterminer des facteurs prédictifs des anomalies de croissance au cours du diabète maternel.

Nos résultats seront présentés en deux parties. La première partie sera consacrée à l'analyse des gènes impliqués dans la croissance foeto-placentaire dans le diabète maternel par transcriptome placentaire en fin de grossesse dans leur ensemble, dans leurs grandes fonctions biologiques et étudiera plus finement ces résultats transcriptomiques par analyse individuelle des gènes d'intérêt différentiellement exprimés. Elle a fait l'objet d'un article qui sera présenté. La deuxième partie sera dédiée à la cinétique pendant la grossesse de certains de ces gènes d'intérêt, avec un article en cours de finalisation pour soumission. A la fin de ces deux parties, suivra une discussion générale de tous ces résultats.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

PARTIE I

ANALYSE DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA CROISSANCE FŒTO-PLACENTAIRE DANS LE DIABÈTE MATERNEL

La recherche expérimentale chez l'animal apporte de nombreuses informations pour mieux comprendre certains des mécanismes impliqués en pathologie humaine et ainsi avancer en prévention ou en thérapeutique. Dans le cadre de l'étude du diabète, différents modèles expérimentaux sont décrits dans la littérature, avec diabète induit ou spontané.

Parmi les modèles expérimentaux les plus fréquemment utilisés, il y a celui induit par des agents chimiques tels que la STZ. La STZ induit un diabète en provoquant la destruction quasi totale de la cellule bêta des îlots de Langerhans (Akbarzadeh A et al, 2007). La STZ est un antibiotique à large spectre, particulièrement toxique pour les cellules bêta. La STZ inhibe l'oxydation du glucose et induit un stress oxydatif par génération de radicaux libres avec fragmentation et alkylation de l'ADN (Lenzen S et al, 2007). La STZ entre dans la cellule bêta via le transporteur de glucose GLUT 2. Une diminution de GLUT 2 prévient l'effet diabétogène de la STZ (Schnedl WJ et al, 1994). Elle augmente l'activité de la xanthine oxydase. La génération d'anions superoxyde par l'intermédiaire de la xanthine oxydase conduit à la génération de peroxyde hydrogène et de radicaux hydroxyle (Winterbourn CC et al, 1989) entraînant ainsi une diminution de la production d'Adénosine Triphosphate (ATP) et l'inhibition du cycle de Krebs (Akude E et al, 2011). L'obtention du diabète se rapprochant plus de la physiopathologie du DT1) et le degré de l'hyperglycémie varient selon la dose de STZ administrée, se trouvant variables selon les études (Kappen C et al, 2012; Mc Evoy Rc et al, 1984).

D'autres modèles de diabète induit chez l'animal utilisent en association à la STZ ou à l'alloxan, du NCT, également connu sous le nom de vitamine B3. Le NCT est un dérivé amide de l'acide nicotinique. C'est un précurseur utilisé par les cellules pour la synthèse de Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺) (Yamada K et al, 1982). Le NCT inhibe la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP), enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN et du contrôle de l'apoptose (Wilson GL et al, 1988). En général, la PARP est activée par la cassure des brins d'ADN, et induit une réponse rapide aux dommages de l'ADN qu'ils soient d'origine chimique, physique ou inflammatoire. La réparation se traduit par une réduction de la concentration cytoplasmique de NAD⁺ (Sato MS et al, 1992). Le NCT fut à l'origine utilisé avec succès pour inhiber ou neutraliser l'action hyperglycémisante des toxines spécifiques des cellules bêta telles que l'alloxan ou la STZ et ainsi obtenir des taux d'hyperglycémie plus modérés. Ensuite, il montra un effet préventif dans le développement du diabète induit par une pancréatectomie partielle (Yonemura Y et al, 1984) et dans les cas de diabète spontané chez

des souris non-obèse diabétiques (NOD) en permettant la restauration du nombre des cellules à insuline (Yamada K et al, 1982). Une association de NCT-STZ injectée chez la rate avant la conception retrouvait une intolérance de glucose sans diabète chez les mères avec macrosomie fœtale (Cisse O et al, 2013). Il est donc utilisé et validé également dans l'obtention d'un diabète expérimental plus modéré, qui se rapprocherait plus d'un diabète de type 2.

Il existe d'autres modèles de diabète, parmi lesquels la souris nourrie avec un régime riche en graisses (modèle High-Fat Diet). Toutefois, le plus souvent, ces régimes aboutissent à un trouble de la tolérance glucidique sans véritable diabète. Du fait de leur obésité, la procréation est souvent difficile. Comme pour les autres modèles de diabète spontané comme les rats Goto-Kakizaki (GK) sans surpoids (Portha B et al, 2012) ou les rats Zuker Diabetic Fatty (ZDF) avec surpoids (Katsuda Y et al, 2014), leur phénotype associe des facteurs polygéniques et environnementaux. Pour cette raison, afin d'étudier le compartiment placentaire et la croissance fœto-placentaire dans le diabète maternel, nous avons choisi des modèles de diabète induits par les substances chimiques.

Le but était de tester deux conditions d'hyperglycémie différentes, l'une sévère, induite par la STZ et l'autre plus modérée, associant NCT et STZ.

Nous avons réalisé une étude transcriptomique placentaire afin d'analyser l'ensemble des gènes différentiellement exprimés dans le diabète maternel de nos modèles de rates. Nous nous sommes intéressés plus finement par la suite, aux expressions géniques différentielles des groupes diabétiques par rapport au groupe contrôle en analysant les gènes un par un.

Dans le transcriptome dont la méthodologie est décrite au sein de notre article pages 1784-1785 on notait une augmentation notable du gène *Prl8a2* connu aussi sous le nom de Decidual prolactin-related protein (*Dprp*) dans les 2 groupes diabétiques. C'était un des gènes pour lequel, l'expression différentielle était des plus importantes (*Tableau en annexe*). L'appartenance de ce gène à la famille PRL nous a incités à nous intéresser également à la PRL. Nous avons remarqué aussi dans notre étude transcriptomique une forte expression de *Bmp-1* (*Tableau en annexe*) dans les 2 groupes diabétiques comparés aux contrôles. Si on faisait le lien avec la PRL, il apparaissait que la BMP-1 étant capable de cliver la PRL, pouvait générer plusieurs fragments aux activités anti-angiogéniques, les vasoinhibines.

I- OBJECTIFS

C'est ainsi, partant de ces constatations, du rôle antiangiogénique des vasoinhibines, de l'intérêt récent comme nous avons vu pour la PRL dans le diabète, qu'il nous est apparu intéressant de:

- 1.** Valider ces résultats transcriptomiques par qPCR dans nos 2 modèles de rates gestantes diabétiques
- 2.** Etudier les vasoinhibines placentaires dans nos 2 modèles de rates diabétiques
- 3.** Valider nos données concernant la famille PRL chez l'homme. Le seul représentant de la famille PRL étant la PRL elle même, nous avons donc fait le parallèle avec l'animal chez l'homme en étudiant l'expression génique de la PRL et l'analyse protéique des vasoinhibines dans des placentas de femmes diabétiques ayant présenté à la naissance des nouveaux-nés de plus petite taille, sans complication vasculaire préalable du diabète.

Cette analyse à la fois chez l'Homme et l'animal concernant la famille PRL dans le placenta a fait l'objet de notre première publication.

1^{ER} ARTICLE

Placental antiangiogenic prolactin fragments are increased in human and rat maternal diabetes.

Perimenis P, Bouckenooghe T, Delplanque J, Moitrot E, Eury E, Lobbens S, Gosset P, Devisme L, Duvillie B, Abderrahmani A, Storme L, Fontaine P, Froguel P, Vambergue A.

Biochim Biophys Acta. 2014, 1842 (9); 1783-1793, accepted on Jun 28, doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.026

II- PRINCIPAUX RÉSULTATS

A- DONNÉES PHÉNOTYPIQUES ET MÉTABOLIQUES DE NOS RATES GESTANTES DIABÉTIQUES

Les rates issues des 2 groupes STZ et NCT-STZ étaient diabétiques, insulinoprivées avec une sévérité plus importante du diabète dans le groupe STZ que NCT-STZ.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES NON PRÉSENTÉS DANS NOTRE ARTICLE

En parallèle de la prise pondérale quotidienne, était effectuée chez les rates une prise alimentaire, une cétonémie déterminée par capillarité à l'aide du lecteur OptiumXceed™ (Abott/Medisense, Rungis, France) et ces données n'avaient pas été présentées dans l'article.

A partir de E14, seul le groupe STZ perdait du poids de façon significative comparé au groupe contrôle ou au groupe NCT-STZ. Malgré cette perte de poids pour le groupe STZ et cette stabilité pondérale pour NCT-STZ comparés au contrôles, on notait une hyperphagie des rates dans les 2 groupes diabétiques comparées aux contrôles. Cependant les rates STZ étaient hyperphages ($p < 0.01$) à partir de E9 jusque E12 et les rates NCT-STZ ($p < 0.01$) de E9 jusque E15 comparées au groupe contrôle (*Figure 31*).

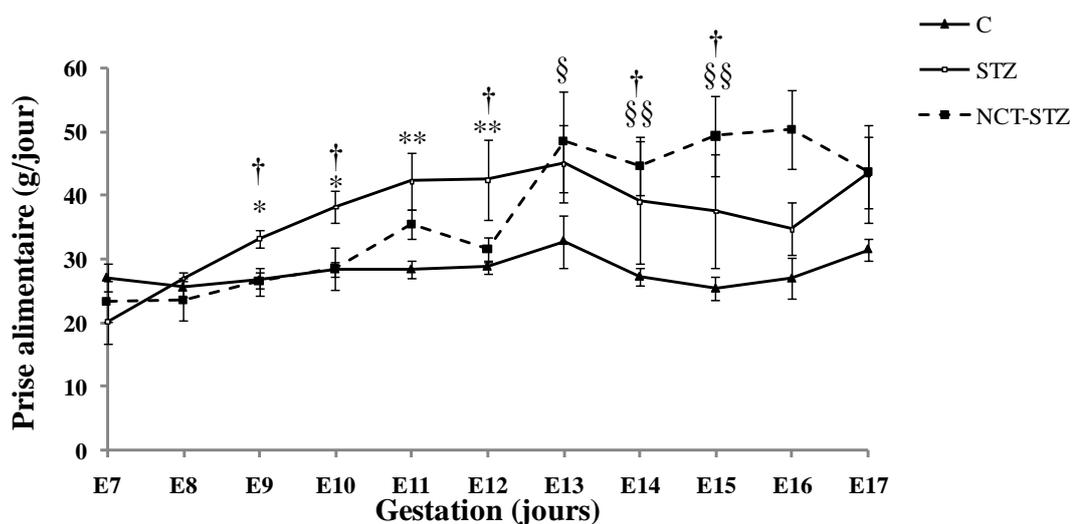


Figure 31 Évolution de la prise alimentaire des rates pendant la gestation

Les résultats sont représentés par des moyennes \pm SEM et sont significativement différents pour * $p < 0.05$ STZ vs C; ** $p < 0.01$ STZ vs C; § $p < 0.05$ NCT-STZ vs C; §§ $p < 0.01$ NCT-STZ vs C; † $p < 0.05$ STZ vs NCT-STZ

Les rates issues des 2 groupes diabétiques étaient, nous le rappelons, diabétiques, insulinoprives avec une sévérité plus importante du diabète dans le groupe STZ que NCT-STZ. En parallèle, l'analyse de la cétonémie maternelle, n'était pas différente dans le groupe NCT-STZ comparé au groupe contrôle. Par contre, les rates devenaient hypercétonémiques dans le groupe STZ ($p < 0.01$) en comparaison au groupe contrôle dès 24 heures après l'injection de STZ. Le groupe STZ demeurait hypercétonémique par la suite jusqu'au terme et la cétonémie maternelle était significativement plus élevée en comparaison au groupe NCT-STZ pendant toute la durée de la gestation (*Figure 32*).

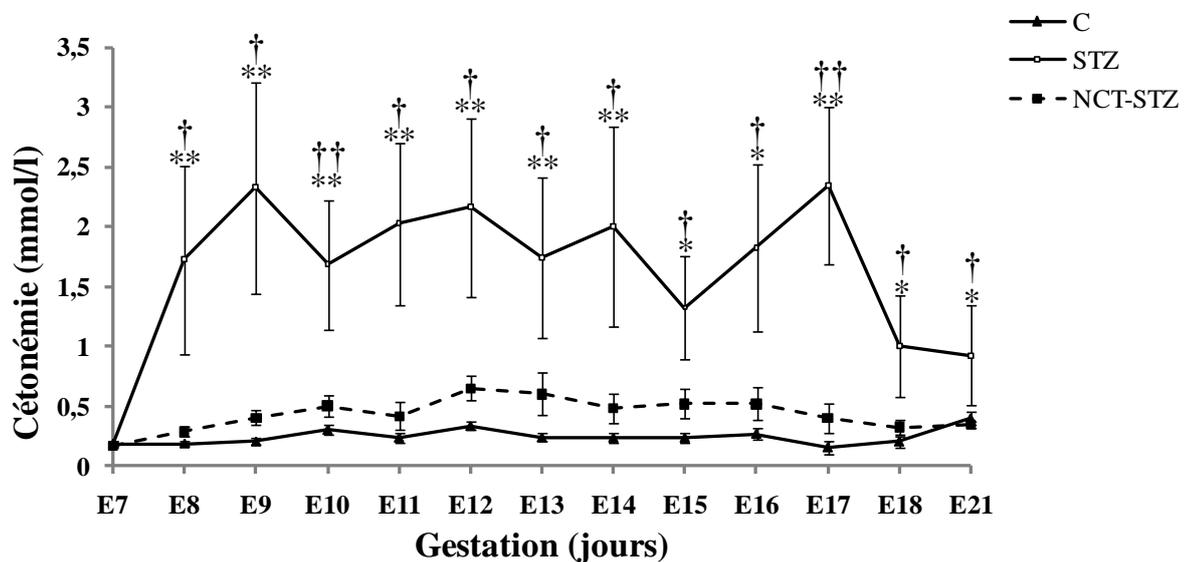


Figure 32 Évolution de la cétonémie des rates pendant la gestation.

Les résultats sont représentés par des moyennes \pm SEM et sont significativement différents pour * $p < 0.05$ STZ vs C; ** $p < 0.01$ STZ vs C; † $p < 0.05$ STZ vs NCT-STZ; †† $p < 0.01$ STZ vs NCT-STZ

B- DONNÉES PHÉNOTYPIQUES DES RATONS ET DE LEUR PLACENTA À E21

Nous avons mis en évidence un RCIU des ratons à la naissance dans les 2 groupes diabétiques comparés aux contrôles. De plus, nous avons retrouvé une hypertrophie placentaire expliquée en partie par une augmentation des dépôts de glycogène dans le labyrinthe et dans la zone de jonction.

Nous avons observé néanmoins sur certains placentas, un œdème qui pourrait expliquer en partie la placentomégalie. Il est assez difficile de mettre clairement en évidence la présence d'un œdème au niveau tissulaire. En effet, nos placentas ont été fixés puis déshydratés pour être inclus en paraffine rendant l'identification de l'œdème délicate. Néanmoins, certains ratons du groupe STZ présentaient un œdème généralisé (anasarque) qui le plus souvent était associé à un œdème placentaire. L'examen histologique avait permis de plus de mettre en évidence des microvacuoles au sein de nos placentas qui, outre le dépôt de glycogène, pouvaient être le reliquat de la présence d'œdème interstitiel.

C- DONNÉES TRANSCRIPTOMIQUES PLACENTAIRES À E21

L'analyse de l'expression différentielle des gènes placentaires au sein des groupes STZ comparée au groupe contrôle nous a permis d'identifier 693 gènes (325 gènes sous-exprimés et 368 sur-exprimés). En ce qui concerne la comparaison du groupe NCT-STZ au groupe Contrôle, 677 gènes (301 sous-exprimés et 376 sur-exprimés) étaient différentiellement exprimés. Parmi ceux là, 457 gènes étaient communs aux 2 groupes diabétiques, impliqués dans de grandes fonctions biologiques.

D- SUREXPRESSION DE *Dprp* DANS LE PLACENTA DIABETIQUE A E21

Parmi, les gènes communs, *Dprp* était surexprimé dans les groupes diabétiques en comparaison des contrôles. Nous avons démontré et validé nos résultats par qPCR avec une surexpression 4 fois plus importante de *Dprp* dans le placenta de nos rates diabétiques à E21 en comparaison du groupe contrôle.

E- ÉLÉVATION DE LA PRL AU NIVEAU PLASMATIQUE CHEZ LES RATES AU 21^{ÈME} JOUR DE GESTATION

Au niveau plasmatique, la prolactinémie était augmentée dans les 2 groupes diabétiques comparés aux contrôles.

F- ÉLEVATION DES VASOINHIBINES PLACENTAIRES CHEZ L'HOMME ET LE RAT ET DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DE L'ENZYME DE CLIVAGE, BMP-1 EN CAS DE DIABÈTE MATERNEL

1- Chez l'animal

Nous avons démontré de plus, une surexpression de *Bmp-1* placentaire dans nos groupes diabétiques. Les vasoinhibines placentaires, les fragments de 14- et 16-kDa de PRL, étaient augmentés dans nos modèles diabétiques, par western blot suite à une augmentation du clivage de la PRL comparés aux contrôles.

L'étude histologique a mis en évidence une hypovascularisation dans les 2 modèles diabétiques en comparaison au groupe contrôle.

2- Chez l'Homme

Nous avons voulu confirmer nos résultats placentaires chez l'animal dans le placenta issu de femmes diabétiques. Nous avons choisi d'étudier des patientes diabétiques de type 1 ayant eu un enfant avec RCIU sans autre cause pouvant expliquer ce RCIU que le diabète afin faire le parallèle avec notre modèle animal.

Dans le placenta de ces femmes diabétiques de type 1, nous avons démontré les mêmes anomalies à savoir surexpression de la PRL sur le plan génique, augmentation des vasoinhibines placentaires et hypovascularisation placentaire. On notera que chez nos femmes diabétiques de type 1, nulle n'était compliquée sur le plan microangiopathique, ne présentait pas de prééclampsie, ni d'hypertension artérielle.

G- CONCLUSION

Nous avons démontré chez le rat et l'humain une implication de la famille PRL au niveau du placenta à terme dans des conditions de diabète maternel avec petit poids de naissance.

POINTS-CLÉS

- RCIU des ratons issus de des mères diabétiques à E21 avec placentomégalie,
- Surexpression de *Dprp placentaire chez les rates diabétiques. à E21*
- Surexpression placentaire du gène *Bmp-1*, capable de clivage de la PRL *chez les rates diabétiques à E21,*
- Augmentation du clivage de la PRL en faveur de la production de produits N-terminaux aux propriétés anti-angiogéniques appelés aussi vasoinhibines à E21.
- Hypovascularisation avec diminution des diamètres des capillaires fœtaux et de la densité des capillaires fœtaux dans nos 2 modèles diabétiques à E21
- La PRL plasmatique était augmentée à E21 dans nos groupes diabétiques comparés au contrôle.
- Chez l'Homme, surexpression de la PRL placentaire, surexpression de BMP-1 Et élévation des vasoinhibines placentaires en cas de diabète de type 1 maternel

PARTIE II

ANALYSE DE CERTAINS MEMBRES DE LA FAMILLE PRL À E14, E17 ET E21

L'objectif maintenant était d'étudier l'implication placentaire des gènes *Dprp*, *Bmp1* en s'intéressant à leur expression à différents moments physiologiquement clés de la gestation et en quantifiant les produits de clivage de la PRL, les vasoinhibines à ces mêmes temps afin d'en obtenir une cinétique afin de déterminer des facteurs prédictifs plus tôt, dans les phases plus précoces de la grossesse.

Ces données étaient étudiés dans nos deux mêmes modèles diabétiques utilisés préalablement, à savoir rates gestantes traitées par STZ seule ou en association avec le NCT en comparaison à un groupe contrôle .Les paramètres métaboliques foeto-placentaires étaient également étudiés à ces même temps, ainsi que la prolactinémie maternelle.

Ce travail fera l'objet de notre 2^{ème} article, en cours de rédaction pour soumission.

2^{ÈME} ARTICLE

Placental PRL family is involved in rat maternal diabetes at different stages of the gestation

Article en cours de rédaction pour soumission dans *Biochimica Biophysica Acta (BBA)* basis of molecular disease

I- MATÉRIEL ET MÉTHODES

A- ANIMAUX

Des femelles Wistar, âgées de 3 mois, en provenance de Janvier (Le Genest Saint Isle, France) étaient mises en cage individuelle et nourries ad libitum avec un régime standard sous des conditions contrôlées de température ($22\pm 1^\circ\text{C}$) et de cycle jour/nuit 12/12 h. Toutes les expérimentations animales étaient conduites en accord avec le Conseil Directif Européen de Communication du 24 Novembre 1986 (86/609/EEC).

B- COMPOSITION DES GROUPES EXPÉRIMENTAUX

A leur 7^{ème} jour embryonnaire de gestation (E7), 3 groupes d'animaux étaient constitués:

- le groupe STZ (n=13) recevant par voie intra-péritonéale un solvant (NaCl 0.9%) puis 65mg/kg de STZ (diluée dans un tampon citrate 0.1M pH 4.5, Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France),
- le groupe NCT-STZ group (n=13), recevant en intra-péritonéal du nicotinamide ((NCT), Sigma-Aldrich) à 75mg/kg dilué dans du NaCl 0.9% et de façon séquentielle à 15 minutes d'intervalle, de la STZ à raison de 65mg/kg et
- le groupe contrôle (C, n=15), injecté de façon séquentielle des 2 solvants (Tampon citrate 0.1 M, pH4.5, puis NaCl 0.9%).

C- PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL (Figure 33)

1- Du 8^{ème} jour jusqu'au sacrifice

Des glycémies capillaires non à jeun étaient effectuées quotidiennement (ACCU-CHEK Performa Glucometer, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Les rates étaient pesées quotidiennement d'E7 à E21 (Figure 33).

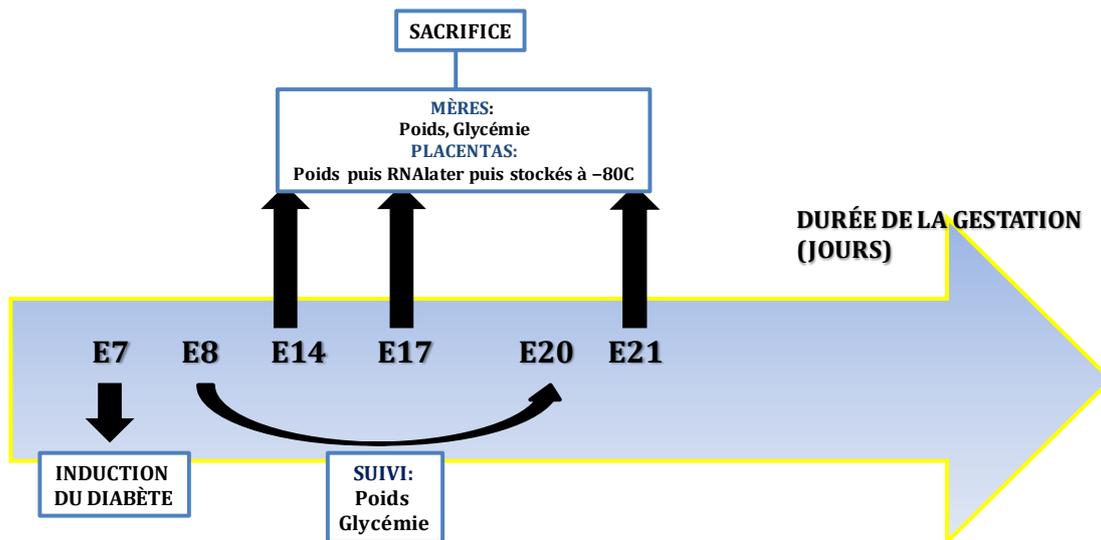


Figure 33 Protocole Expérimental

2- Collection des prélèvements sanguins et des tissus chez le rat

Les rates étaient sacrifiées par décapitation à E14 (n=7 pour C; n=6 pour STZ; n=7 pour NCT-STZ), à E17 (n=8 pour C; n=7 pour STZ; n=6 pour NCT-STZ) et à E21 (n=9 pour C; n=5 pour STZ; n=9 pour NCT-STZ) (Figure). Les fœtus étaient individualisés avec leurs placentas respectifs. Les placentas étaient pesés et lavés dans du Phosphate Buffered Saline (PBS) et transférés soit dans des cryotubes contenant du RNAlater (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour l'analyse de l'expression génique, soit dans l'azote liquide pour l'expression protéique puis stockés à -80°C ou fixés dans du paraformaldehyde (PFA) 4% pour analyse histologique.

3- Analyse de l'expression génique placentaire chez le rat

a- Extraction de l'ARN

5 placentas étaient aléatoirement sélectionnés issus des rates sacrifiées. L'ARN total était isolé grâce au kit RNeasy® (Qiagen, France). La quantification et la qualité de l'ARN étaient respectivement étudiées par spectrophotométrie UV grâce au NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France) et par électrophorèse capillaire par bioanalyseur (Agilent Bioanalyzer capillary electrophoresis system, Agilent technologies France, Massy, France) pour s'assurer que l'ARN ne soit pas dégradé.

b- qRT-PCR pour l'analyse de l'expression génique

L'ARN total était rétrotranscrit grâce au kit High capacity cDNA RT (Applied Biosystems, Foster city, CA). Des qRT-PCR par méthode TaqMan ont été effectuées grâce à des sondes sur les gènes d'intérêt (*Table 6*) en triplicats pour chaque échantillon d'ARN en utilisant l'Universal Master Mix (Applied Biosystems) et l'Applied Biosystems 7900HT detection system (programme de cycles de 10 min d'incubation à 95°C suivi de 40 cycles à 95°C). Les valeurs (Cycle Threshold [Ct]) étaient extraites grâce au logiciel SDS (Applied Biosystems). L'expression génique était normalisée avec le gène beta 2 microglobulin (B2M).

Gène	Assay ID	Accession number	Nom du gène
<i>Rat Bmp1</i>	Rn01466024_m1	NM_031323.1	Bone Morphogenetic Protein 1
<i>Rat Dprp</i>	Rn00575655_m1	NM_022846.1	Decidual prolactin-related protein
<i>Rat B2M</i>	Rn00560865_m1	NM_012512.2	Beta-2 microglobulin

Table 6 Sondes pour PCR TaqMan

4- Western blot placentaire

70 µg de protéines de chaque placenta prélevé à E14 ou E17 ou E21 étaient déposés sur gel à 12% SDS-PAGE. Trois placentas étaient randomisés par rate. L'analyse par Western Blot était réalisée avec un anticorps anti PRL de lapin (1/200, Santa Cruz Biotechnology). Pour la normalisation de nos résultats, nous avons utilisé un anticorps de souris anti-alpha tubuline (1/5000, Sigma). Nous avons utilisé de la PRL extraite d'hypophyse de rat pour nos contrôles positifs. Les protéines étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham BioSciences, Chalfont, UK), détectées par un anticorps secondaire horseradish-conjugated (1/5000; Santa Cruz Biotechnology) et révélées par Chemiluminescence Supersignal (Pierce). L'analyse densitométrique était effectuée par le logiciel imageJ (National institutes of Health, Maryland, USA), avec normalisation des résultats pour l'alpha-tubuline.

5- Etude histologique des placentas

3 placentas provenant de chaque rate étaient sélectionnés aléatoirement. Des coupes dans les blocs de paraffine de 5 µm d'épaisseur étaient effectuées après déparaffinage dans le xylène. Les lames étaient colorées par l'Hématoxyline-Eosine (HE) ou avec le Periodic Acid Schiff (PAS) avec ou sans amylase. À E21, les lames étaient incubées avec un anticorps monoclonal de souris anti-CD31 (1:40, DAKO, Glostrup, Denmark) selon les instructions. La densité capillaire était estimée par comptage des capillaires par mm². Les densités capillaires des capillaires fœtaux étaient estimées par mm² et par comptage. Le diamètre des capillaires (µm) était estimé grâce un oculomètre sur plusieurs champs avec un objectif oculaire à 40 ×. Les structures capillaires étaient individualisées en les comparant à des hématies nucléées à E14 et E17 (Coan PM et al, Biol Reprod, 2004). Compte tenu des difficultés à distinguer par cette même méthode les structures capillaires à E21, nous avons préféré à ce stade, le recours à l'immunomarquage par CD31 afin de mieux différencier le sang maternel du sang foetal.

D- ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats représentent des moyennes ± SEM. Les comparaisons statistiques étaient effectuées par one way ANOVA suivi d'un post-test de Tukey en utilisant GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA). Une p value ≤ 0.05 était considérée comme significative.

II- PRINCIPAUX RÉSULTATS

A- DONNEES PHÉNOTYPIQUES ET MÉTABOLIQUES DE NOS RATES GESTANTES DIABÉTIQUES

Trois groupes de rates gestantes étaient constitués selon leur âge gestationnel au moment du sacrifice. Ainsi, les rates sacrifiées à E14 ou E17 ou E21, constituaient respectivement le groupe de rates E14; E17 et E21. L'évolution du poids des rates et de leur glycémie est représentée sur la *Figure 34*.

1- Evolution du poids des rates pendant la gestation

Pendant la gestation, l'évolution du poids des rates n'était pas différente dans les 3 groupes expérimentaux: STZ, NCT-STZ et contrôle jusqu'E14. Après E14, seul le groupe STZ, ($p < 0.05$) présentait une perte de poids significative par rapport au groupe contrôle et au groupe NCT-STZ (*Figure 34 A*).

1- Evolution des glycémies des rates pendant la gestation

Comme attendu, les rates issues des groupes STZ ($p < 0.001$) et NCT-STZ ($p < 0.001$) développaient une hyperglycémie significative par rapport aux contrôles dès 24 heures après injection de la STZ avec une sévérité plus importante dans le groupe STZ ($p < 0.05$) que NCT-STZ (*Figure 34 B*).

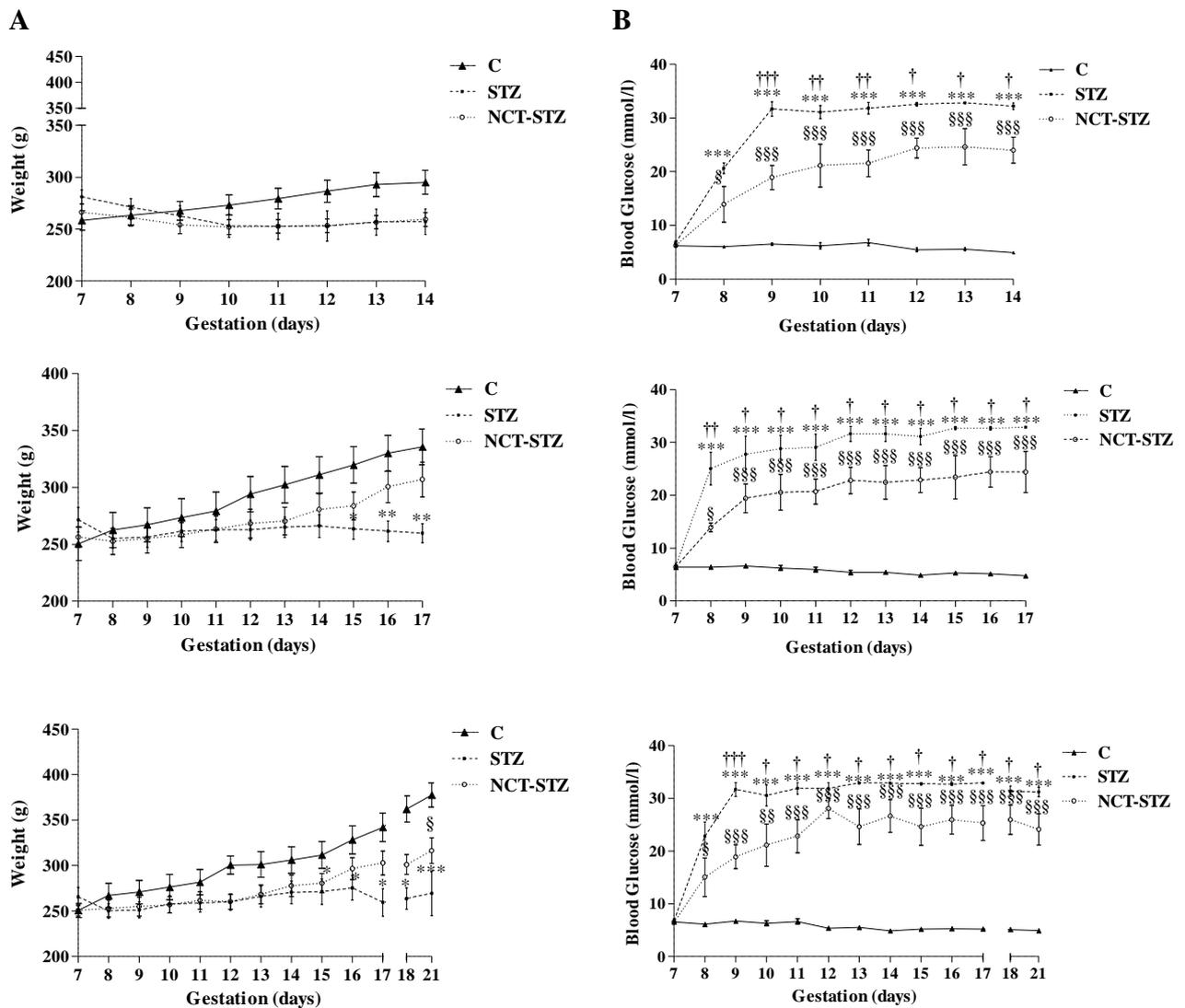


Figure 34 Analyse des paramètres phénotypiques et métaboliques des rates pendant la gestation. Poids (A) et glycémie (B) des rates à E14, E17 et E21

STZ: streptozotocine; NCT: nicotinamide; C: contrôles. Les résultats représentent des moyennes \pm SEM et sont significativement différents à * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ STZ vs C; § $p < 0.05$ §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ NCT-STZ vs C; † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$ STZ vs NCT-STZ.

B- ÉVALUATION DE LA PROLACTINÉMIE MATERNELLE AU COURS DE LA GESTATION

Nous avons évalué l'effet du diabète sur la prolactinémie maternelle au cours de la gestation à E14, E17 et E21 (*Figure 35*). La prolactinémie n'était pas différente à E14 et E17 mais significativement augmentée dans les 2 groupes STZ (29.19 ± 3.61 ng/ml, $p < 0.01$) et NCT-STZ (18.81 ± 2.89 ng/ml, $p < 0.01$) comparée au groupe contrôle (4.47 ± 0.45 ng/ml) à E21. Le profil cinétique de la prolactinémie montrait une diminution progressive pour tous les groupes entre E14 et E21. Toutefois, la diminution physiologique entre E17 et E21 qui a lieu dans le groupe contrôle n'est pas retrouvée dans les groupes diabétiques ($p < 0.001$).

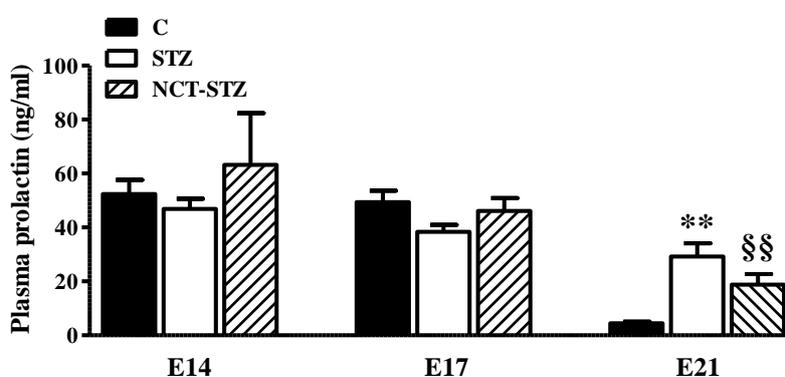


Figure 35 Analyse des taux de PRL plasmatique maternelle à E14, E17 et E21

STZ: streptozotocine; NCT: nicotinamide; C: contrôles. Les résultats représentent des moyennes \pm SEM et sont significativement différents à $**p < 0.01$ STZ vs C, $§§p < 0.01$ NCT-STZ vs C.

C- DONNEES PHÉNOTYPIQUES FŒTAUX ET DE LEUR PLACENTA

Nous avons analysé les poids fœtaux et placentaux à différents âges gestationnels E14, E17 et E21.

1- Analyse des poids fœtaux

Le poids fœtal, (*Figure 36 A*), était significativement réduit dans les 2 groupes diabétiques à E14 ((STZ (0.11 ± 0.004 g, $p < 0.001$) et NCT-STZ (0.11 ± 0.003 g, $p < 0.001$)) ; à E17((STZ (0.66 ± 0.01 g, $p < 0.001$)) et NCT-STZ (0.61 ± 0.02 g, $p < 0.001$)) et à E21 ((STZ

(3.55 ± 0.19 g, $p < 0.001$) and NCT-STZ (4.18 ± 0.09 g, $p < 0.001$) comparés au groupe contrôle (0.16 ± 0.003 g à E14; 0.83 ± 0.007 g à E17 et 5.57 ± 0.04 g à E21).

2- Analyse des poids placentaires

Le poids placentaire (*Figure 36 B*) était significativement diminué dans le groupe STZ (0.12 ± 0.006 g, $p < 0.001$) et NCT-STZ (0.11 ± 0.004 g, $p < 0.001$) comparés au groupe contrôle (0.20 ± 0.01 g) à E14 avec dès lors, une prise de poids du placenta progressive avec normalisation dans un premier temps dans le groupe STZ (0.49 ± 0.02 g) comparé au groupe contrôle (0.47 ± 0.007 g) à E17 puis placentomégalie pour les groupes STZ (0.73 ± 0.02 g, $p < 0.001$) et NCT-STZ (0.63 ± 0.01 g, $p < 0.001$) à E21 comparés au groupe contrôle (0.56 ± 0.007 g).

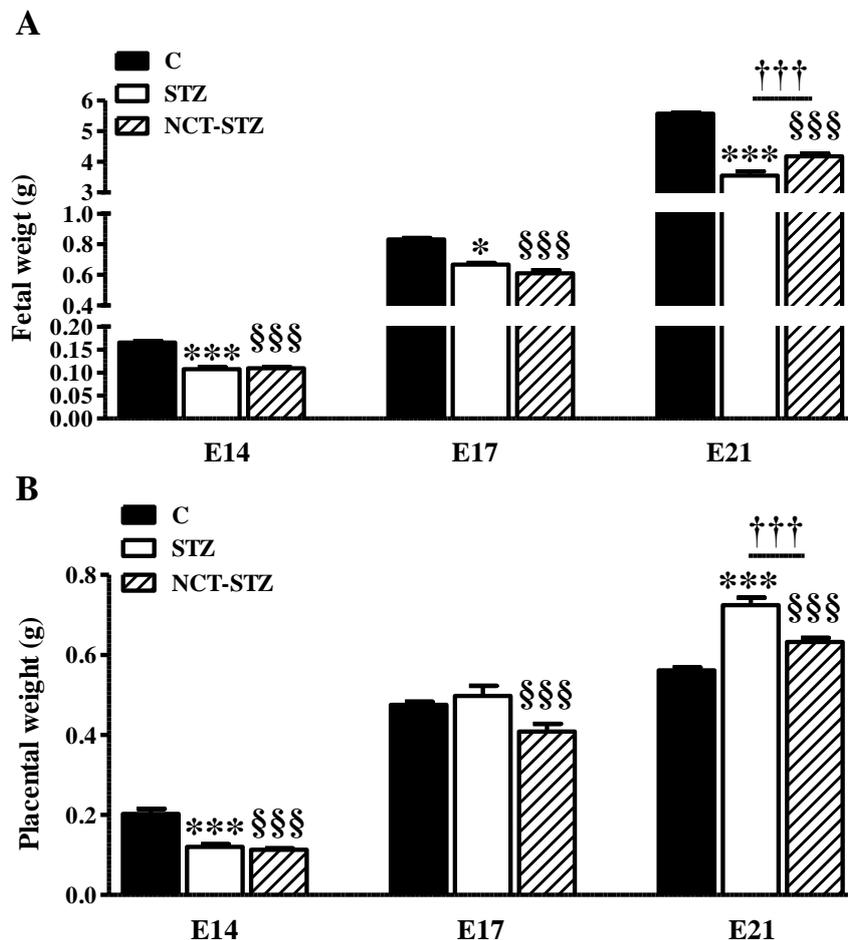


Figure 36 Analyse des poids fœtaux et placentaires à E14, E17 et E21. Poids fœtaux (A) et placentaires (B). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM et sont significativement différents à * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ STZ vs C; \$\$\$ $p < 0.001$ NCT-STZ vs C; ††† $p < 0.001$ STZ vs NCT-STZ.

L'efficacité placentaire, ratio entre le poids fœtal sur le poids placentaire n'était pas différente à E14 et E17 mais significativement diminuée dans les 2 groupes diabétiques STZ (5.04 ± 0.22 , $p < 0.001$) et NCT-STZ (6.83 ± 0.20 , $p < 0.001$) comparés au groupe contrôle (10.10 ± 0.14) à E21 (*Figure 37*).

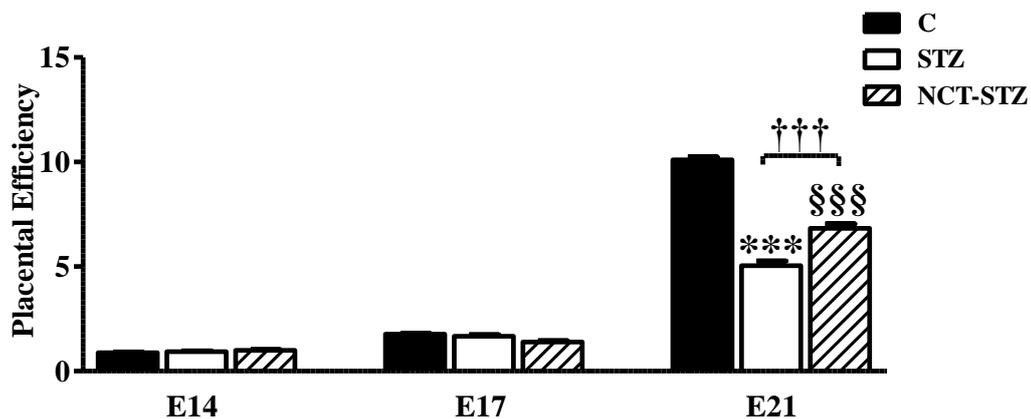


Figure 37 Analyse de l'efficacité placentaire (ratio poids fœtal/poids placentaire) à E14, E17 et E21. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM et sont significativement différents à $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ STZ vs C; $$$$p < 0.001$ NCT-STZ vs C; $+++p < 0.001$ STZ vs NCT-STZ
STZ: streptozotocine; NCT: nicotinamide; C: contrôles.

2- Analyse histologique des placentas

En parallèle à l'évolution du poids placentaire, des dépôts de glycogène étaient retrouvés dans les 3 groupes (*Figure 38*) au niveau de la zone de jonction à E14 exclusivement puis à travers le labyrinthe à partir de E17 jusqu'au terme avec un marquage beaucoup plus faible mais persistant au niveau de la zone de jonction. Les dépôts de glycogène envahissent le labyrinthe graduellement pendant la gestation de la zone de jonction vers le labyrinthe. Si on compare les groupes entre eux, les dépôts de glycogène sont identiques à E14 avec une augmentation du marquage à partir d'E17 dans la zone de jonction et dans le labyrinthe dans nos 2 groupes diabétiques.

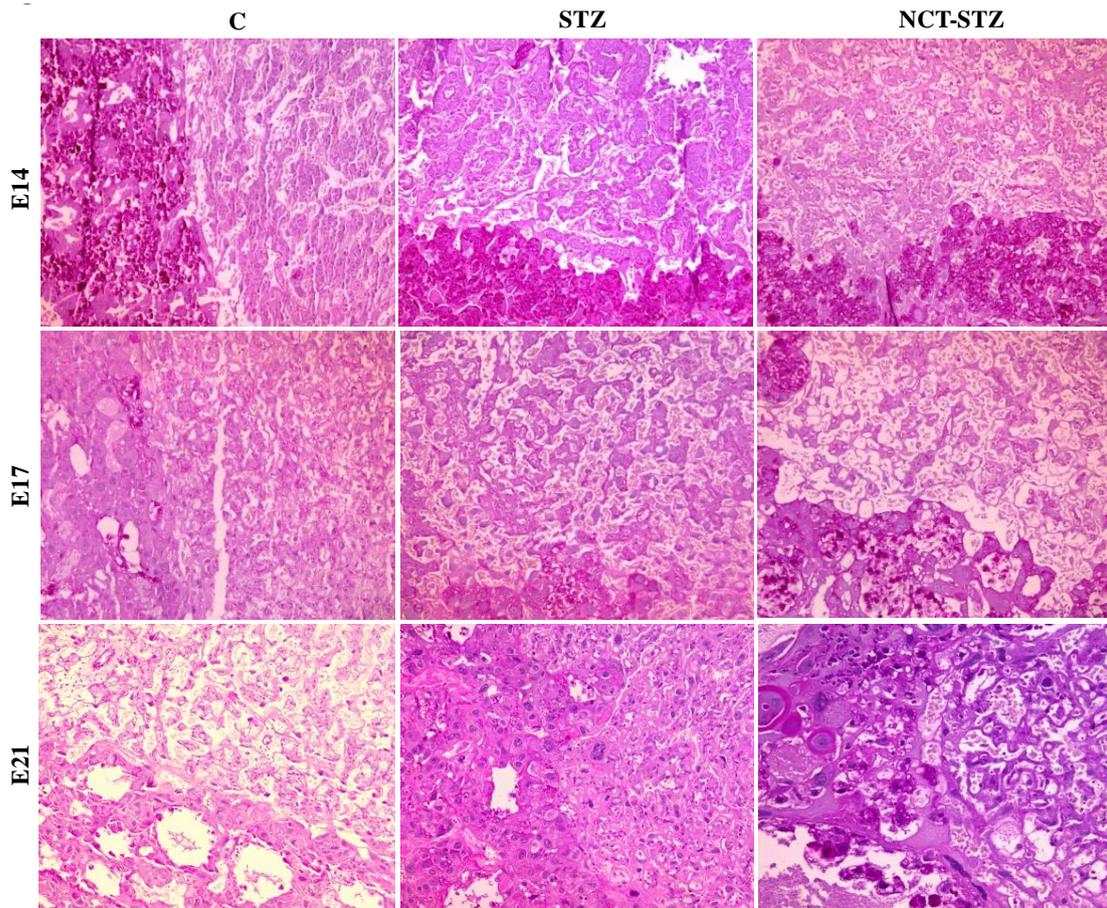


Figure 38 Coupes de placentas colorées par le Periodic Acid Schiff (PAS) à E14, E17 et E21. Grossissement $\times 100$. Présence de dépôts de glycogène placentaire PAS positifs (coloration rouge-violacée). STZ: streptozotocine; NCT: nicotinamide; C: contrôles.

D- SUREXPRESSIION DE *Dprp* À PARTIR DU 17^{ÈME} JOUR DE GESTATION

Nous avons analysé l'expression de *Dprp* à E14, E17 et E21 (*Figure 39*). Il n'y avait pas de différence d'expression de *Dprp* entre groupes à E14. L'expression de *Dprp* était approximativement 2.5-fois plus augmentée dans les groupes STZ ($p < 0.01$) et NCT-STZ ($p < 0.05$) à E17 et 4-fois plus augmentée dans les groupes STZ ($p < 0.01$) et NCT-STZ ($p < 0.01$) comparés aux contrôles à E21. Il n'y avait pas de différence d'expression de *Dprp* entre les groupes STZ et NCT-STZ à tous les âges gestationnels étudiés. Si on analysait l'expression de *Dprp* de chacun des groupes expérimentaux pris individuellement entre E14 à E21, elle diminuait dans le groupe contrôle ($p < 0.01$), ce qui n'était pas le cas dans les 2 groupes diabétiques STZ et NCT-STZ où elle n'était pas modifiée.

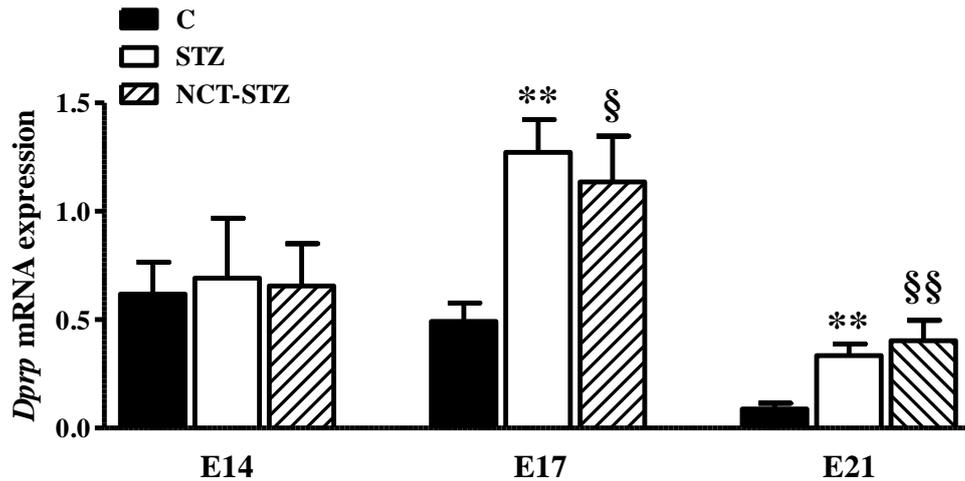


Figure 39 Expression du gène de la decidual prolactin-related protein (*Dprp*) à E14, E17 et E21. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM et sont significativement différents à $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ STZ vs C; $§§p < 0.01$ NCT-STZ vs C.

E- L'EXPRESSION GÉNIQUE DE *Bmp-1*, LE CLIVAGE DE LA PRL ET LA VASCULARISATION SONT MODIFIÉS PENDANT LA GROSSESSE DANS LE PLACENTA ISSU DU RAT DIABÉTIQUE

1- Expression de *Bmp-1* au cours de la gestation

L'évolution de l'expression de *Bmp-1* pendant la gestation est représentée *Figure 40 A*. Il n'y avait pas de différence d'expression génique de *Bmp-1* à E14 entre les groupes puis *Bmp-1* était dans un premier temps sous-exprimé à E17 dans les groupes STZ ($p < 0.001$) et NCT-STZ ($p < 0.01$) comparés aux contrôles puis surexprimé dans les groupes STZ ($FC \approx 1.5$, $p < 0.05$) et NCT-STZ ($FC \approx 2$, $p < 0.001$) à E21 comparés aux contrôles. Il n'y avait pas de différence d'expression de *Bmp-1* entre les groupes STZ et NCT-STZ à tous les âges gestationnels étudiés. Si on analyse l'expression de *Bmp-1* de chacun des groupes expérimentaux pris individuellement entre E14 et E21, on retrouve une augmentation entre E14 et E17 dans le groupe contrôle ($p < 0.001$), ce qui n'était pas le cas pour les 2 groupes diabétiques où l'expression n'était pas modifiée.

2- Clivage de la PRL

La forme native (23-kDa) et les formes clivées dans le placenta sont représentées par western Blot (*Figure 40 B*) puis quantifiées (*Figure 40 C*). Il n'y avait pas de différence concernant le clivage de la PRL à E14 dans tous les groupes expérimentaux.

En parallèle de l'expression génique de la *Bmp-1* au cours de la gestation, le ratio de la quantité de PRL clivée sur la quantité de PRL native était dans un premier temps significativement réduit dans les groupes STZ ($p < 0.001$) et NCT-STZ ($p < 0.01$) à E17 puis augmenté dans les groupes STZ ($p < 0.05$) et NCT-STZ ($p < 0.05$) à E21 en comparaison du groupe contrôle. On notait une augmentation significative du clivage de la PRL dans les groupes diabétiques entre E17 et E21 en comparaison du groupe contrôle. L'évolution du profil cinétique du clivage de la PRL entre E14 et E21 était la même pour tous les groupes expérimentaux avec augmentation de E14 à E21, avec toutefois une augmentation beaucoup plus forte dans les groupes STZ ($p < 0.001$) et NCT-STZ ($p < 0.001$) en comparaison au groupe contrôle ($p < 0.05$).

La quantité de PRL totale (native + clivée) était augmentée dans un premier temps à E14 dans les groupes STZ ($p < 0.05$) et NCT-STZ ($p < 0.01$) comparés aux contrôles sans différence significative après E14 jusqu'à E21 (*Figure 39 D*). La quantification de la quantité totale de PRL était similaire pour tous les groupes après E14.

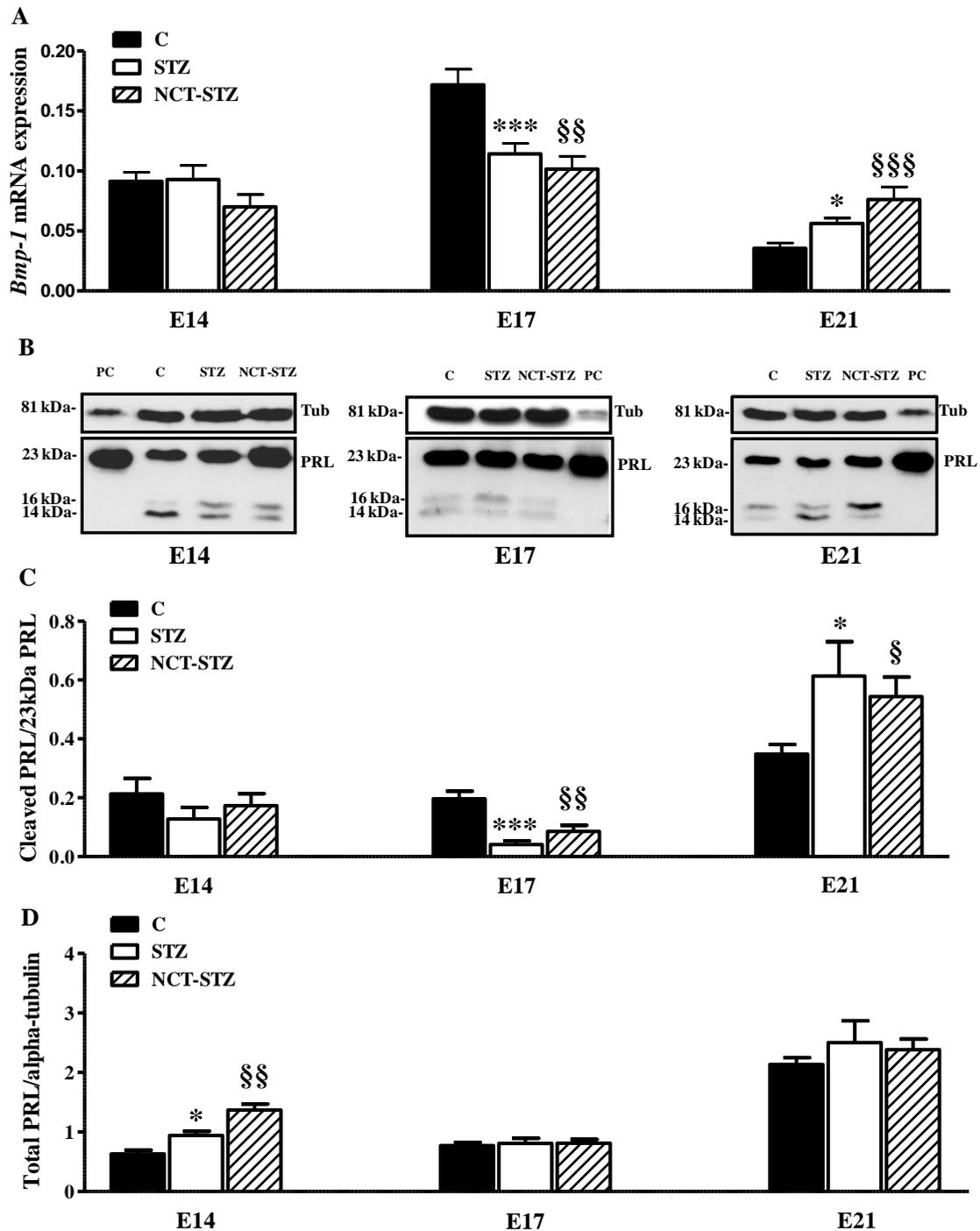


Figure 40 Analyse du clivage placentaire chez le rat diabétique à E14, E17 et E21. Expression du gène Bone morphogenetic protein-1 (*Bmp-1*) à E14, E17 et E21 (A). Western-blot de la prolactine (PRL) placentaire à E14, E17 et E21 (B). PC: positive control. La masse moléculaire de chaque bande est sur la gauche. Quantification du ratio de la PRL clivée sur la PRL de 23-kDa (C) et de la PRL totale (somme de la PRL clivée et de la PRL de 23-kDa) (D) dans le placenta à E14, E17 et E21. La PRL clivée est la somme des fragments de ≈ 16 -kDa PRL et ≈ 14 -kDa PRL. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM. STZ: streptozotocine; NCT: nicotinamide; C: contrôles. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ STZ vs C; \$ $p < 0.05$; \$\$ $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.001$ NCT-STZ vs C.

3- Analyse histologique et immunohistochimique de la vascularisation placentaire

Compte tenu de l'implication des vasoinhibines dans l'angiogénèse, l'étude de la vascularisation placentaire est cruciale. Nous avons analysé les placentas diabétiques et montré qu'il existait une hypervascularisation à E17 puis une hypovascularisation à E21. Le diamètre des capillaires fœtaux suivait la même évolution que la densité capillaire (*Figures 41 A et B*).

Le nombre de capillaires (densité) était doublé à E17 avec une augmentation de 100% dans les groupes diabétiques comparés aux contrôles. Dans un deuxième temps, la densité capillaire était réduite de 34 % pour les 2 groupes diabétiques à E21 comparés aux contrôles (*Figure 41 B*). Il n'y avait pas de différence significative entre groupes à E14.

Le diamètre des capillaires (*Figure 41 C*) était cependant augmenté à E14 dans les groupes STZ ($24.22 \pm 2.03 \mu\text{m}$, $p < 0.001$), NCT-STZ (24.25 ± 1.6 , $p < 0.001$) comparés aux contrôles ($13.88 \pm 1.03 \mu\text{m}$,) et à E17 dans les groupes STZ (19.58 ± 1.42 , $p < 0.05$) et NCT-STZ (20.34 ± 2.18 , $p < 0.05$) comparés au contrôle (13.79 ± 1.15) avec une réduction à E21 dans le groupe STZ ($5.37 \pm 0.26 \mu\text{m}$, $p < 0.001$) et NCT-STZ ($5.57 \pm 0.23 \mu\text{m}$, $p < 0.001$) comparés aux contrôles ($10.37 \pm 0.55 \mu\text{m}$).

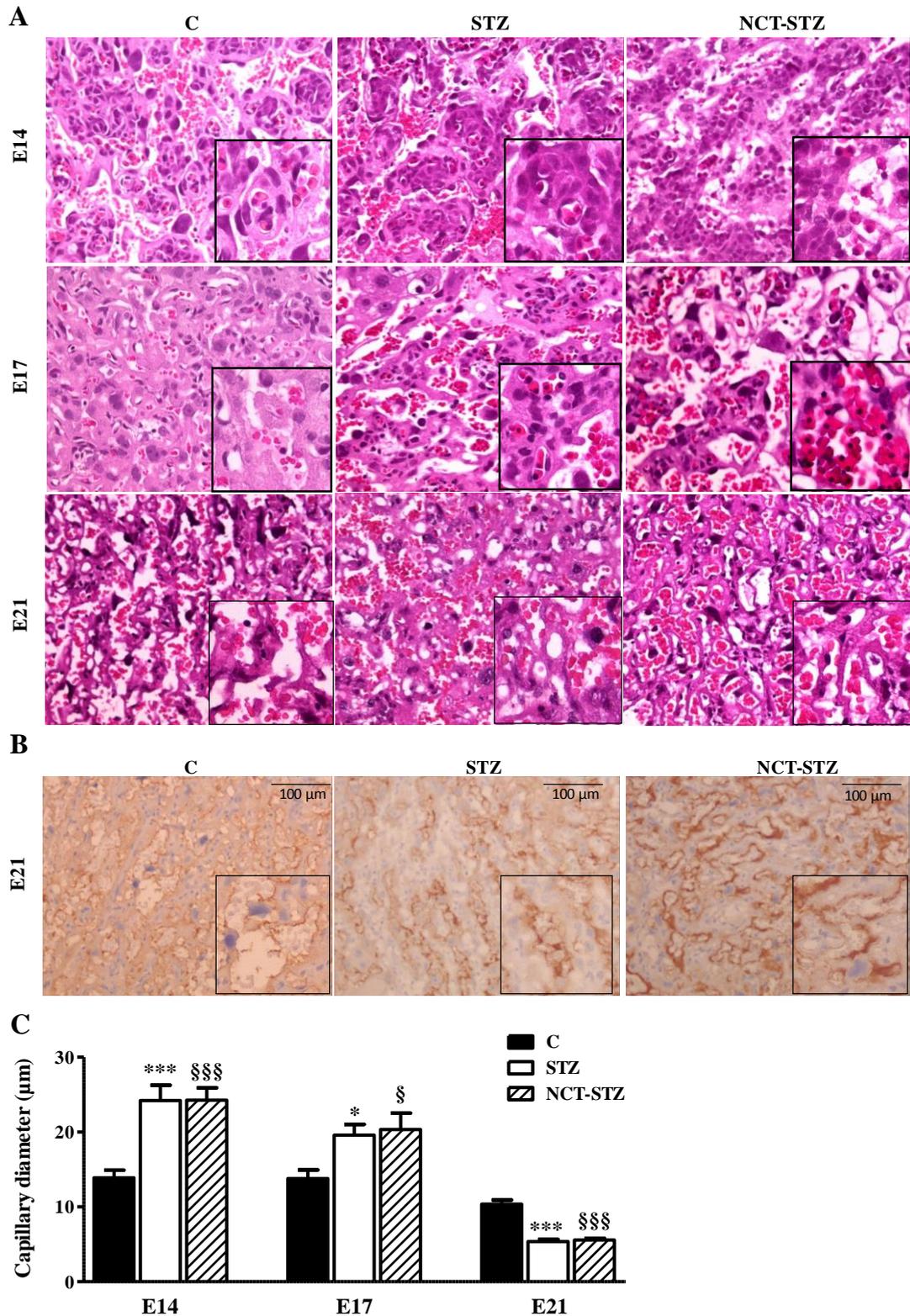


Figure 41 Coupes histologiques colorées par hématoxyline-éosine chez les contrôles, STZ et NCT-STZ (A) at E14, E17 et E21. Immunomarquage placentaire par CD31 chez les STZ, NCT-STZ et contrôles à E21 (B). Analyses stéréotaxiques du diamètre des capillaires du labyrinthe (C) à E14, E17 et E21. STZ: streptozotocine; NCT: nicotinamide; C: contrôles. Grossissement $\times 200$ et dans l'encadré $\times 400$

III- CONCLUSION

En conclusion, la famille PRL est impliquée dans le diabète maternel dans le dernier tiers de la grossesse chez le rat diabétique avec un rôle surtout dans le dernier tiers de la grossesse dans la vascularisation placentaire et l'adaptation à l'hyperglycémie.

POINTS-CLÉS

- RCIU des ratons issus de des mères diabétiques dès E14 avec variation du poids placentaire entre E14 et E21, diminué à E14; normalisé à E17 et augmenté à E21
- Surexpression de *Dprp placentaire* chez les rates diabétiques. dès E17
- Variation placentaire du gène *Bmp-1*, avec variation parallèle du clivage de la PRL entre E14 et E21; soit non différent à E14; diminution à E17; augmentation à E21
- Modifications de la vascularisation placentaire entre E14 et E21, avec variations parallèles aux vasoinhibines; soit hypervascularisation à E17 et hypovascularisation à E21
- La PRL plasmatique était augmentée à E21 dans nos groupes diabétiques sans différence à E14 et E17

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le placenta s'adapte à son environnement afin de permettre la survie fœtale. Dans le diabète, le dysfonctionnement placentaire expose le fœtus à des troubles de croissance ainsi qu'à des désordres métaboliques à long terme. Toutefois, les mécanismes responsables du dysfonctionnement placentaire associé au diabète maternel en lien avec les anomalies fœtales, restent encore mal expliqués.

L'objectif de ce travail de thèse fut de cartographier les modifications géniques du placenta d'un modèle de rates gestantes, rendues diabétiques par l'administration de STZ. L'étude du transcriptome placentaire a permis de mettre en évidence l'implication de la famille PRL à E21 dans le placenta, mais aussi plus tôt dans la gestation dès E14 dans le cadre du diabète maternel chez le rat, compliqué de RCIU. De plus, nous avons confirmé l'implication de la famille PRL chez l'Homme dans des placentas de femmes diabétiques de type 1 à terme, avec petit poids de naissance.

Nous avons voulu étudier le placenta chez la rate dans deux conditions d'hyperglycémie maternelle, une sévère, proche du diabète de type 1 et une plus modérée.

I- CHOIX DE NOS MODÈLES MURINS

Le rôle de la STZ dans le développement du diabète et ses conséquences sur le poids fœtal ou sur l'insulinémie fœtale est hautement variable (Jawerbaum A et al, 2010; Mc Evoy Rc, 1984). Il n'est pas toujours facile d'obtenir un diabète léger à modéré. Le degré de réponse à la STZ varie selon les doses de STZ à partir de 35 mg/kg. Pour une même dose de 35 mg/kg, nous pouvons obtenir un diabète modéré (120–300 mg/dL) (Portha B et al, 1974) comme un diabète sévère (>300 mg/dL) (Mc Evoy Rc et al, 1984) selon la fenêtre d'injection (López-Soldado I et al, 2003) selon les facteurs nutritionnels maternels (Kappen C et al, 2012). Une dose moindre inférieure à 30 mg/kg peut aboutir à l'absence d'intolérance de glucose et des conditions de glycémie similaires au contrôle (López-Soldado I et al, 2003).

Nous avons donc choisi, d'utiliser un modèle de rat traité par la STZ pour l'obtention du diabète sévère, modèle validé de longue date. Pour éviter les conséquences aléatoires de l'obtention d'un diabète modéré avec de petites doses de STZ, nous avons plutôt choisi une autre stratégie d'induction du diabète en détruisant partiellement la masse de cellules bêta, en utilisant

une association de NCT et de STZ pour notre deuxième modèle. Cette association combinée de STZ et de NCT est validée dans la littérature pour l'étude du diabète de type 2 (Yamada K et al, 1982; Mojani MS et al, 2014). Ce modèle avait récemment été utilisé pour déterminer les effets d'une hyperglycémie modérée maternelle sur la croissance fœtale et apporter quelques hypothèses physiopathologiques sur la dysfonction placentaire (Cisse O et al, 2013). Ce qui était intéressant dans ce modèle était l'existence d'une macrosomie fœtale, ce qui n'avait jusqu'à présent pas été démontré chez les rates gestantes diabétiques puisque toutes les données de la littérature étaient en faveur d'un RCIU. Contrairement à d'autres modèles de diabète décrits dans la littérature, ce traitement combiné de NCT et STZ pendant la grossesse n'avait pas induit dans cette étude, d'effets sur la viabilité fœtale, ni de malformations fœtales et aboutissait à une intolérance au glucose et non pas à un diabète avec comme conséquence pour le fœtus une macrosomie. Il s'agit de la seule étude à notre connaissance, étudiant ce traitement combiné pendant la grossesse.

Notre modèle de diabète sévère insulino-prive, hypercétonémique, avec RCIU était obtenu assez facilement, s'apparentant au diabète de type 1, comme c'est souvent le cas avec la STZ. Par contre, nous nous attendions à développer avec le modèle NCT-STZ, un diabète moins sévère, non insulino-prive, s'apparentant plus au diabète de type 2, plus proche du diabète pré-gestationnel de type 2 ou du diabète gestationnel avec macrosomie fœtale, ce qui n'avait jusqu'à présent pas été démontré chez les rates gestantes diabétiques puisque toutes les données de la littérature étaient en faveur d'un RCIU. Nous avons obtenu un diabète, certes moins sévère, mais insulino-prive, cependant sans cétonémie augmentée, avec RCIU, qui s'apparentait également plus au diabète de type 1.

Nos résultats d'hyperglycémie maternelle étaient différents de l'étude de Cisse *et. al* (Cisse et al, 2013). Ils obtenaient une intolérance au glucose sans diabète, nous avons obtenu un diabète insulino-prive, moins sévère. Cependant les conditions expérimentales étaient différentes. Nous avons pris l'option d'une injection au 7^{ème} jour de la gestation, contrairement à eux, qui injectaient une semaine avant la conception. Nous avons utilisé une dose de 75 mg/kg contre 250 mg/kg dans leur étude et il est admis que le NCT a un effet dose-dépendant, plus la dose est forte, plus l'effet protecteur est important (Yamada K et al, 1982). Nous voulions obtenir des conditions de diabète maternel et non pas une simple intolérance au glucose. Lorsque ce travail de thèse a débuté, l'unité EA 4489 ne possédait pas l'autorisation de faire de la reproduction animale, autorisation qui vient d'être très récemment accordée.

Nous avons pris l'option d'une injection au 7^{ème} jour de gestation. On peut se demander si l'injection de STZ et/ou de NCT affecte nos résultats sur le pancréas fœtal. De plus en plus, l'injection de STZ dans les études est faite au moment de la procréation, en néonatal, ou très tôt dans la grossesse avant le 5^{ème} jour, ces fenêtres d'injection étant considérées préférables à la fenêtre d'injection plus tardive pour mieux s'assurer de l'absence d'effets directs sur le fœtus de la STZ, plus tard dans la gestation (Lopez-Soldado I et al, 2003).

Néanmoins, la formation du pancréas fœtal commence au 9.5^{ème} jour de gestation et la demi-vie de la STZ est très courte, de 20 minutes ainsi que celle du NCT de 5 heures. La STZ induirait donc un diabète maternel à ce stade sans affecter directement le pancréas fœtal. Le GLUT2 qui est la cible d'action de la STZ n'est pas exprimé dans le pancréas fœtal à ce stade de développement (Lenzen S et al, 2008; Schnedl WJ et al, 1994). De plus la STZ n'a pas d'effet sur le contenu pancréatique de l'insuline chez le rat et n'a pas d'effet cytotoxique direct sur le pancréas fœtal *in vitro* (Golob EK et al, Diabetes, 1970).

II- CHOIX DES ÂGES GESTATIONNELS D'ÉTUDE DU PLACENTA MURIN AU COURS DE LA GESTATION

Après avoir choisi nos modèles, il nous était important de définir les temps gestationnels d'étude du placenta. Étudier la fin de la gestation, E21, nous semblait être requis, et ainsi faire un état des lieux du placenta juste avant la délivrance. Nous avons voulu évaluer ensuite le placenta à différentes périodes physiologiquement clés du développement foeto-placentaire murin en cas de diabète maternel afin d'en établir une cinétique de nos principaux résultats et déterminer des facteurs prédictifs dans les premières phases de développement

La structure définitive du rat est hémitrichorial avec ses 3 couches: la décidue, la zone de jonction et le labyrinthe. Le labyrinthe contient des espaces sanguins maternels et des capillaires fœtaux. Il est clairement établi que chez le rat, sous des conditions physiologiques, le placenta se forme surtout à E12 avec en parallèle une réduction des couches trophoblastiques et de la barrière foeto-placentaire et se termine à E18 avec un pic développemental à E14 et une taille maximum à E16.5 avec un élargissement du labyrinthe et particulièrement des espaces vasculaires maternels. Cependant, les capillaires fœtaux continuent leur croissance jusqu'à E18.5 chez le rat (Coan PM et al, 2004).

Il nous est donc apparu essentiel d'étudier le placenta à ces moments clés de la grossesse chez le rat: E14, E17 et le terme E21. Etudier E12 plutôt que E14 aurait été intéressant mais nous n'avons pas réussi à individualiser le placenta à ce stade dans nos essais préliminaires. Nous avons donc choisi E14, qui correspond au début du dernier tiers de la grossesse.

III- CHOIX DE LA POPULATION ETUDIÉE CHEZ L'HOMME

Nous avons voulu confronter nos principaux résultats de nos modèles animaux chez l'Homme. En ce qui concerne notre choix d'étude du placenta humain, nous avons choisi de nous intéresser plutôt aux situations de patientes diabétiques de type 1 ayant donné naissance à des enfants avec RCIU afin de valider ou invalider les résultats obtenus chez l'animal. Nous avons choisi des patientes n'ayant pas de complications microangiopathiques du diabète ni d'hypertension artérielle prégravidique ou gravidique puisque dans ces situations le RCIU aurait plutôt été rapporté aux complications associées qu'au diabète *stricto sensu*.

IV- QUE NOUS A APPORTÉ LE TRANSCRIPTOME PLACENTAIRE CHEZ LE RONGEUR À E21 ?

Notre travail de thèse est une des rares études transcriptomiques de la littérature placentaire dans le cadre du diabète maternel. Une autre étude placentaire est décrite dans la littérature chez la femme diabétique de type 1 et chez des patientes ayant un diabète gestationnel montrant que les modifications des expressions de gènes sont différentes dans ces 2 situations cliniques qui ont des physiopathologies très différentes (Radaelli T et al, 2009).

Il nous a semblé intéressant d'analyser nos résultats transcriptomiques de deux façons. La première consistait à les analyser dans leur ensemble, dans leur grande fonction. Tout d'abord, pour ce qui est des gènes différentiellement exprimés versus contrôle qui différaient entre les groupes diabétiques, il n'était pas surprenant de noter que la STZ impliquait surtout des gènes de l'apoptose et du cycle cellulaire compte tenu de l'action très cytotoxique de celle-ci. Ces anomalies étaient beaucoup moins retrouvées dans le groupe NCT-STZ compte tenu de l'inhibition des effets cytotoxiques de la STZ par le NCT, où étaient accentués dans ce cadre

des mécanismes plutôt de réparation de l'ADN. Ces résultats étaient tout à fait concordants avec le mécanisme d'action des 2 drogues et de l'effet protecteur du NCT.

Parallèlement, nous avons analysé les gènes communs des deux groupes diabétiques compte tenu du phénotype proche de diabète insulino-prive avec RCIU qui nous a permis de mettre en évidence une implication de la famille PRL placentaire dans le diabète maternel en cas de petit poids de naissance des nouveaux-nés à terme chez le rat, que nous avons également par la suite confirmé chez l'Homme, qui a fait l'objet de notre publication.

V- IMPLICATION DE LA FAMILLE PRL CHEZ L'HOMME ET LE RONGEUR

A- POURQUOI S'Y INTÉRESSER ?

De plus en plus de papiers récents s'intéressent à la PRL dans le diabète. Elle aurait un rôle de prolifération sur les cellules bêta en activant leur synthèse et leur sécrétion d'insuline via la voie JAK/STAT (Friedrichsen BN et al, 2003). On lui connaît également un rôle protecteur dans le développement de l'hyperglycémie chez le rat diabétique avec diabète induit par la STZ (Holstad M et al, 1999). Cependant, aucune étude dans la littérature à notre connaissance n'a étudié la PRL native ou les PRL-like dans le placenta en cas de diabète maternel.

La décidue, comme nous avons vu, a un rôle crucial dans la grossesse, avec de multiples fonctions comme partenaire du trophoblaste dans l'invasion trophoblastique, son rôle nutritif pour le développement embryonnaire, le maintien de la grossesse (Moser G et al, 2010). Des désordres dans le développement des cellules déciduales en cas d'inactivation du gène *Prl* chez la souris ne sont pas compatibles avec la progression de la grossesse et aboutissent à des avortements précoces (Jabbour HN et al, 2001). La PRL déciduale stimule chez l'humain l'invasion trophoblastique dans les phases précoces de la grossesse dans la grossesse *in vitro* (Stefanoska I et al, 2013).

Nos résultats transcriptomiques nous ont permis de mettre en évidence une surexpression placentaire de *Dprp* à E21. Le rôle de la DPRP est mal connu et peu décrit dans la littérature. Sa localisation placentaire est identique à celle de la PRL, dans la décidue (Prigent-Tessier A et al, 1985; Roby KF et al, 1993) et pourrait suggérer des homologies de fonction mais cela doit être démontré. Des études concernant les souris inactivées pour le gène *Dprp* aboutissent à des interruptions totales de la grossesse dès E7.5 sous des conditions hypoxiques et suggèrent un rôle de DPRP dans le maintien de la grossesse (Alam SM et al, 2007).

Il est suggéré dans plusieurs études dans la littérature que les vasoinhibines, résultant du clivage post-traductionnel de la PRL, aux activités anti-angiogéniques, puissent jouer un rôle dans la physiopathologie de la prééclampsie (Parra A et al, 2002) ou dans l'hypertension artérielle gravidique (Masumoto A et al, 2010). Une élévation des vasoinhibines placentaires est retrouvée en cas de petit poids de naissance avec corrélation négative entre le poids de naissance et la quantité de vasoinhibines dans la prééclampsie (Toft JH et al, 2008). Peu d'études cependant décrivent les vasoinhibines dans le diabète. Quelques rares études, toutefois, s'y sont intéressées dans la rétinopathie diabétique (RD). Il semblerait que les vasoinhibines aient un rôle protecteur dans la progression de la rétinopathie diabétique par leur action antiangiogénique dans l'œil et leur action bloquante sur la vasoperméabilité de la rétine (Triebel J et al, Life, 2011).

C'est ainsi, partant de ces constatations, de l'implication de la PRL dans le diabète et de son rôle dans l'invasion trophoblastique, du rôle antiangiogénique des vasoinhibines et leur implication dans la prééclampsie, et de nos résultats transcriptomiques placentaires chez le rongeur à E21, que nous avons étudié la famille PRL placentaire dans le diabète maternel.

B- IMPLICATION DE LA FAMILLE PRL DANS LE DIABÈTE MATERNEL

Nous avons observé une surexpression du gène *Dprp* nos placentas murins dès E17. Nous savons que l'expression génique de *Dprp* est initiée à E6 avec un pic à E12 et diminue à partir d'E14 (Rasmussen CA et al, 1997). La DPRP est exprimée uniquement au niveau de la décidue antimésométriale jusqu'à à E13. À partir d'E13, on commence à la détecter dans les

cellules mésométriales puis dans le dernier tiers de la gestation, au niveau du syncytiotrophoblaste et cytotrophoblaste (Rasmussen CA et al, 1997).

La décidue est en effet composée de deux régions avec des rôles bien définis et différents; le pôle antimésométrial participant à l'implantation de l'embryon et le pôle mésométrial, crucial pour les flux sanguins placentaires (Aplin J et al, 2000; Welsh AO et al, 1985). Il n'a pas été retrouvé de différence d'expression de *Dprp* entre les groupes expérimentaux à E14 mais par contre une surexpression de ce gène à E17 ET E21 chez la rate gestante diabétique en comparaison au groupe contrôle. Ceci pourrait suggérer un rôle pour ce gène à l'adaptation de la condition hyperglycémie pendant la grossesse pour assurer le maintien de celle-ci en accord avec la localisation chorio-allantoïque mais d'autres études sont nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Chez l'Homme, le gène de la PRL placentaire était surexprimée dans le placenta des femmes diabétiques de type 1 à terme. Chez le rongeur, la PRL était en excès sous sa forme protéique chez le rongeur à E14. Ces données vont dans le même sens que la littérature, à savoir que la PRL interviendrait dans les phases précoces de la grossesse pour assurer le maintien de celle-ci (Stefanoska I et al, 2013). Il a été proposé que chacune des PRL-like du rongeur ou d'une autre espèce qui en possède, ait un rôle de "sous-spécialisation" de la globalité de la fonction biologique que pourrait avoir la PRL elle-même chez l'Homme, puisque elle est dans ce dernier cas l'exemplaire unique de la famille PRL. La DPRP (une sous-spécialité du rôle de la PRL dans la grossesse ?) et la PRL pourraient toutes deux jouer un rôle dans le maintien de la grossesse en cas d'hyperglycémie, mais cela doit être démontré.

Quant aux vasoinhibines placentaires, celles-ci étaient impliquées dans le placenta diabétique à la fois chez l'Homme à la délivrance et chez l'animal à partir d'E17. Nous suggérons qu'elles puissent participer également à la physiopathologie de la dysfonction placentaire au moins en cas de petit poids de naissance, par leur rôle anti-angiogénique et proapoptotique.

La BMP-1 est impliquée dans le clivage de la PRL (Ge G et al, 2007). Les acteurs de ce clivage de la PRL qui génère les vasoinhibines peuvent être nombreux outre la BMP-1, comme les métalloprotéases, la cathepsine D (Baldocchi RA et al, 1993; Marcotella Yet al, 2006). C'est ici un des seuls acteurs candidats de ce clivage que nous avons retrouvé dans notre étude, le

lien direct reste cependant à être démontré. Son expression dans le placenta est cependant parallèle à la cinétique des vasoinhibines au cours de la gestation.

VI- RELATIONS ENTRE LES PHÉNOTYPES FŒTO-PLACENTAIRES, LA FAMILLE PRL ET L'ANGIOGÉNÈSE DANS LE DIABÈTE MATERNEL

A- RCIU À E14 ET HYPOTROPHIE PLACENTAIRE

Le RCIU était présent chez les rats diabétiques dès E14, à un stade très précoce. Le poids placentaire était diminué à ce stade en parallèle mais nous n'avons pas noté de différence ni sur le plan génique, ni histologique, ni protéique à ce stade excepté peut-être une augmentation des diamètres des capillaires fœtaux et une augmentation dans la quantité protéique en PRL, proangiogénique (Struman I et al, 1999) dans le placenta.

Cette augmentation de la PRL placentaire à ce stade pourrait participer à l'augmentation des diamètres capillaires pour permettre la survie du fœtus et ainsi augmenter ses apports nutritionnels et en oxygène. Le mécanisme direct reste cependant à être démontré.

B- RCIU ET COMPENSATION PLACENTAIRE À E17

À partir d'E17, la vascularisation et la quantité placentaire de vasoinhibines se modifient significativement dans nos modèles diabétiques avec une prise de poids placentaire pouvant correspondre à un mécanisme de compensation.

Il est admis qu'autour d'E14, le placenta est capable de compenser son propre retard de croissance en régulant positivement ses apports nutritionnels (Angiolini E et al, 2006). Nous avons retrouvé une augmentation des dépôts de glycogène à ce stade dans la zone de jonction et dans le labyrinthe. Nous rappelons qu'en physiologie les cellules à glycogène migrent dans la décidue et prolifèrent entre E12.5 et E16.5 (Adamson SL et al, 2002). Leur rôle serait la libération du glucose dans le sang maternel qui irrigue le labyrinthe à la fin de la gestation, permettant ainsi d'assurer les besoins fœtaux durant cette période de forte croissance (Coan PM

et al, 2006). L'augmentation dans le placenta diabétique des cellules à glycogène permettrait dans ce cas de RCIU d'augmenter les besoins énergétiques du fœtus.

E17 correspond en physiologie à l'expansion maximum des espaces vasculaires placentaires (Coan PM et al, 2004). Le RCIU pourrait être à ce stade lié à la capacité métabolique diminuée du placenta à palier au défaut de croissance fœtal. Nous suggérons que le placenta adapte son angiogénèse en l'augmentant de façon plus importante qu'à E14 (augmentation à la fois de la densité et du diamètre des capillaires) pour assurer la survie du fœtus. Les vasoinhibines pourraient participer à cette hypervascularisation placentaire.

C- RCIU ET HYPERTROPHIE PLACENTAIRE À E21

À E21, nous avons mis en évidence un RCIU des rats avec une hypertrophie placentaire dans les groupes de rates diabétiques. Cette hypertrophie placentaire était en partie expliquée par une augmentation des dépôts de glycogène dans le labyrinthe et dans la zone de jonction. Le glycogène est une source énergétique non négligeable pour le fœtus. Le mécanisme de la placentomégalie à terme n'est pas très étudié dans la littérature dans les modèles de rates traitées par la STZ avec des études plutôt d'ordre histopathologique. Ainsi, ont été décrits à terme, une dégénération kystique du spongiotrophoblaste, une fibrose, une ischémie, des dépôts de glycogène, un œdème ou des dépôts lipidiques (Robinson J et al, Diabetes, 1988).

Nous avons observé sur certains placentas à E21 un œdème qui pourrait expliquer en partie la placentomégalie. Il était assez difficile de mettre clairement en évidence la présence d'un œdème au niveau tissulaire. En effet, nos placentas ont été fixés puis déshydratés pour être inclus en paraffine rendant l'identification de l'œdème délicate. Néanmoins, certains rats du groupe STZ présentaient un œdème généralisé (anasarque) qui le plus souvent était associée à un œdème placentaire. L'examen histologique avait permis de mettre en évidence des microvacuoles au sein de nos placentas qui, outre le dépôt de glycogène, pouvaient être le reliquat de la présence d'œdème interstitiel. Il serait intéressant de rechercher la présence de dépôts lipidiques mais la fixation en paraffine de nos placentas ne le permettait pas. De tels dépôts ont déjà été observés dans les placentas hypertrophiques. L'utilisation de tissus frais, non déshydratés, sera à envisager surtout que l'étude du transcriptome placentaire nous avait permis de mettre en évidence une modification des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et

la biochimie des petites molécules (quantité, clivage, conversion, production, hydrolyse des lipides, quantité de stéroïdes), ce qui rend cette recherche tout à fait pertinente.

Enfin, le placenta à E21 était hypovasculaire. L'hypothèse serait un épuisement des capacités placentaires à augmenter son angiogénèse avec une insuffisance placentaire qui s'accroît à ce stade responsable du RCIU. On note en parallèle des vaso-inhibines augmentées, qui vont encore une fois dans le même sens que la vascularisation et pourraient avoir un lien qui reste à démontrer.

VII- FACTEURS PRÉDICTIFS

Il a été démontré chez des femmes prééclamptiques ayant une augmentation des vaso-inhibines placentaires, une augmentation parallèle de ces vaso-inhibines dans leurs urines et dans leur liquide amniotique. Il s'agissait dans ce cas d'un marqueur de gravité de la pathologie (Leanos-Miranda A et al, 2013). Ainsi, nous suggérons qu'elles puissent être un facteur prédictif d'anomalie vasculaire en cas de RCIU dans le diabète maternel par dosage dans le liquide amniotique ou dans les urines. Cette hypothèse reste à être démontrée dans le cadre d'une étude en recherche clinique. De plus ce dosage pourrait avoir un intérêt s'il serait prédictif très tôt au cours de la grossesse avec une meilleure spécificité et sensibilité que les données échographiques.

VIII- LIMITES DE NOS MODÈLES

Une autre question, qui de ce fait se posait, est celle du passage de la STZ et/ou du NCT à travers la barrière placentaire qui pourrait interférer avec nos résultats. Le transfert de la STZ est certainement possible ainsi que celui du NCT. Très peu d'études décrivent ce phénomène surtout chez le rongeur.

Chez le primate gestant, il a été démontré que la STZ traverse le placenta à tous les stades de développement mais que seulement des doses infimes de STZ n'atteignent le compartiment fœtal. Il a été démontré l'absence de quelconque STZ marquée au carbone 14 au niveau des cellules bêta pancréatique à tous les stades de développement. De même, on notait l'absence de radioactivité élevée au niveau du tissu pancréatique (Reynolds WA et al, 1974).

Toutes ces données suggéraient que la cellule bêta pancréatique ne concentrait pas de drogue cytotoxique. Il a été également démontré que les cellules bêta fœtales étaient beaucoup moins sensibles à cette drogue que les cellules fœtales adultes (Liang XD et al, 2011). Il nous semble donc peu probable que ce passage éventuel de la STZ et/ou du NCT ait influencé nos résultats.

IX- PERSPECTIVES

En conclusion, la famille PRL est impliquée dans le diabète maternel dans le dernier tiers de la grossesse chez le rat diabétique et tout du moins à terme chez l'Homme avec un rôle surtout dans le dernier tiers de la grossesse dans la vascularisation placentaire et dans l'adaptation à l'hyperglycémie.

Des expériences complémentaires et intéressantes seraient d'étudier les mécanismes responsables de la dysrégulation de la PRL placentaire dans le diabète maternel.

Nous avons suggéré que les vasoinhibines puissent être un facteur prédictif d'anomalie vasculaire en cas de RCIU dans le diabète maternel. L'expression sérique de la PRL était augmentée dans le diabète maternel chez nos rongeurs et était associée avec des anomalies de croissance fœtale. Il serait intéressant de rechercher une augmentation des vasoinhibines dans les urines et/ou dans le sang par Western blot dans nos modèles. Cette hypothèse serait également intéressante comme nous l'avons signalé en recherche clinique en effectuant ce dosage chez des femmes enceintes à risque ou non de développer un RCIU dans le cadre du diabète maternel. Cependant, la macrosomie reste la complication la plus courante dans le diabète de type 1. Etudier l'implication de la PRL placentaire dans l'anomalie de croissance en miroir, qui est le développement de la macrosomie fœtale dans le diabète de type 1 est donc tout aussi requise.

L'hyperglycémie chronique contribue à la progression et au développement des complications de la maladie. Les cellules (bêta, muscle,..) exposées à une élévation chronique de glucose présentent des dérégulations géniques, contribuant au dysfonctionnement des cellules (Mandelbaum AD et al, 2012). L'hyperglycémie chronique pourrait être impliquée dans l'augmentation de la PRL. Dans notre étude, les anomalies retrouvées au sein de la famille PRL chez le rat, à savoir expression du gène *Dprp* placentaire et expression protéique des

vasoinhibines n'étaient pas différentes dans nos 2 modèles de rongeurs diabétiques avec hyperglycémie sévère ou modérée. Nous avons conclu à l'absence d'influence du degré de l'hyperglycémie maternelle dans ces anomalies générées mais il faut préciser que dans notre étude les niveaux glycémiques étaient élevés. Des études *in vitro* pourraient être réalisées sur des cellules placentaires cultivées dans des conditions d'hyperglycémie de sévérité et de durée variables. A partir de ces cellules, l'expression de la PRL et de son clivage pourra être étudiée par Western blot. Ainsi, on apporterait plus d'éléments d'ordre mécanistique quant au lien direct entre l'hyperglycémie et la génération de vasoinhibines placentaires selon le degré de sévérité et la durée d'exposition de cette hyperglycémie.

Notre analyse transcriptomique placentaire à E21 dans nos modèles de rongeurs, nous a apporté des informations complémentaires qui pour l'instant n'ont pu être exploitées (*Tableau en annexe*).

Ainsi, le gène de l'ACE2 était sous-exprimé ainsi que le récepteur de l'angiotensine II 1a. D'autres facteurs, comme l'hypoxie maternelle anténatale impliquant le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), peuvent être impliqués dans le RCIU. La rénine convertit l'angiotensinogène en angiotensine I qui est elle-même convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Cette enzyme agit sur la surrénale pour produire l'aldostérone. L'ACE2, quant à elle, transforme l'angiotensine II en angiotensine 1-7. Le SRAA joue un rôle très important dans la régulation des flux sanguins dans le placenta. Des perturbations du SRAA ont été décrites dans le RCIU secondaires à l'hypoxie maternelle ou dans la pré-éclampsie. L'inhibition de l'ACE2 pourrait être impliquée dans les troubles de la tolérance glucidique survenant à l'âge adulte. L'angiotensine 1-7 améliore l'insulinosensibilité (Volpert O et al, 2002). En effet, chez la souris, l'invalidation du récepteur Mas (par lequel agit l'angiotensine 1-7), entraîne l'apparition d'un syndrome métabolique, d'une intolérance au glucose et d'un hyperinsulinisme (Bentzien F et al, 2001). L'ACE2 aurait donc un rôle pivot dans la pathologie diabétique puisqu' une accumulation d'angiotensine II dans les îlots pancréatiques, aboutit à une augmentation de l'inflammation, des radicaux libres, de l'apoptose, ainsi qu'à une diminution du flux sanguin et de la prolifération de la cellule bêta entraînant une diminution de la sécrétion d'insuline. Nous envisageons d'explorer cette voie du SRAA en validant nos données par qPCR, en complétant par d'autres acteurs du SRAA (ACE, angiotensinogène), et d'en établir une cinétique aux autres points clés de la gestation chez nos rongeurs à la recherche d'une implication plus précoce.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La grossesse chez la patiente ayant un diabète pré-gestationnel ou gestationnel reste à ce jour à haut risque pour la mère et pour l'enfant avec ses conséquences à court terme mais aussi à long terme puisqu'elle peut conduire à des conséquences métaboliques pour l'enfant exposé, à l'âge adulte. Toutefois, les mécanismes physiopathologiques en lien avec ces anomalies de croissance dans ce contexte de diabète restent, à ce jour, inexpliqués. A une place stratégique entre la mère et le fœtus, le placenta acteur crucial de la programmation fœtale, va s'adapter à son environnement altéré, celui du diabète maternel, afin de permettre la survie fœtale.

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le compartiment placentaire en analysant l'expression des gènes impliqués dans la croissance fœto-placentaire afin de déterminer des facteurs prédictifs des anomalies de croissance au cours du diabète maternel.

Nos travaux ont mis en évidence le rôle potentiel de la famille PRL placentaire dans les perturbations fœtales liées au diabète maternel chez l'Homme et le rat. Les vasoinhibines placentaires pourraient être des facteurs prédictifs de ces anomalies de croissance fœtale.

ANNEXE

Table en annexe- Analyse de l'expression différentielle de quelques gènes issus de notre étude transcriptomique au sein du placenta.

Symbole	p-value corrigée	Fold change ((NCT-STZ vs [Contrôles])	Régulation	Fold change ([STZ] vs [Contrôles])	Régulation	Definition
Axe glucose-insuline -IGFs						
Igf1r	0,023673533	-1,0891982	down	-1,0216162	down	Rattus norvegicus insulin-like growth factor I receptor (Igf1r), mRNA.
Ins1	0,006649838	-1,9750632	down	-2,0057225	down	Rattus norvegicus insulin 1 (Ins1), mRNA.
Ins2	0,006649838	-3,4466918	down	-3,8866487	down	Rattus norvegicus insulin 2 (Ins2), mRNA.
Irs1	0,006649838	-1,1076043	down	1,0623405	up	Rattus norvegicus insulin receptor substrate 1 (Irs1), mRNA.
Irs3	0,006649838	1,4411665	up	1,166531	up	Rattus norvegicus insulin receptor substrate 3 (Irs3), mRNA.
Igf2bp1	0,006649838	1,1232122	up	1,068143	up	Rattus norvegicus insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 (Igf2bp1), mRNA.
Igf2bp3	0,006649838	1,1889397	up	1,1614153	up	PREDICTED: Rattus norvegicus insulin-like growth factor 2, binding protein 3 (Igf2bp3), mRNA.
Igfbp2	0,006649838	2,2180586	up	1,7979978	up	Rattus norvegicus insulin-like growth factor binding protein 2 (Igfbp2), mRNA.
Inflammation						
Il1b	0,006649838	1,2792416	up	2,037369	up	Rattus norvegicus interleukin 1 beta (Il1b), mRNA.
Il6ra	0,006649838	-2,376174	down	-2,1395352	down	Rattus norvegicus interleukin 6 receptor, alpha (Il6ra), mRNA.
Stress oxydatif						
Prdx3	0,006649838	-1,1246927	down	-1,1690878	down	Rattus norvegicus peroxiredoxin 3 (Prdx3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
Prdx5	0,006649838	-1,2031901	down	-1,0942675	down	Rattus norvegicus peroxiredoxin 5 (Prdx5), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
Gpx3	0,037663877	-1,491571	down	-1,3830878	down	Rattus norvegicus glutathione peroxidase 3 (Gpx3), mRNA.
Gpx1	0,006649838	-1,3381964	down	-1,3059164	down	Rattus norvegicus glutathione peroxidase 1 (Gpx1), mRNA.
Cat	0,015765049	-1,1983182	down	1,2321807	up	Rattus norvegicus catalase (Cat), mRNA.
Maoa	0,006649838	1,3891376	up	1,6896871	up	PREDICTED: Rattus norvegicus monoamine oxidase A (Maoa), mRNA.
Nos2	0,006649838	1,1777356	up	1,4145757	up	Rattus norvegicus nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2), mRNA.
Nfkbia	0,006649838	-1,4517666	down	-1,4505349	down	PREDICTED: Rattus norvegicus nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (Nfkbia), mRNA.
Tgfb3	0,006649838	1,2325156	up	1,3624324	up	Rattus norvegicus transforming growth factor, beta 3 (Tgfb3), mRNA.
Stress du RE						
Xbp1	0,006649838	1,2588046	up	1,2621944	up	Rattus norvegicus X-box binding protein 1 (Xbp1), mRNA.
Traf6_predicted	0,006649838	1,0830139	up	1,1985554	up	PREDICTED: Rattus norvegicus Tnf receptor-associated factor 6 (predicted) (Traf6_predicted), mRNA.
Apoptose						
Jun	0,006649838	1,0706635	up	1,3763767	up	Rattus norvegicus Jun oncogene (Jun), mRNA.
Bnip3	0,006649838	1,1624005	up	1,1464733	up	Rattus norvegicus BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (Bnip3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
Cul5	0,006649838	1,4255031	up	1,4779825	up	Rattus norvegicus cullin 5 (Cul5), mRNA.
Casp2	0,006649838	-1,2662152	down	-1,3210349	down	Rattus norvegicus caspase 2 (Casp2), mRNA.
Voie Jak/Stat						
Jak2	0,006649838	1,178528	up	1,1932628	up	Rattus norvegicus Janus kinase 2 (Jak2), mRNA.
Stat5b	0,006649838	1,299485	up	1,2351037	up	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 5B (Stat5b), mRNA.
Stat3	0,037663877	1,0951499	up	1,1203152	up	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA.
Angiogénèse						
Vegfa	0,011473766	1,2930926	up	-1,0348396	down	Rattus norvegicus vascular endothelial growth factor A (Vegfa), mRNA.
Egfr	0,019874698	-1,1982312	down	-1,0206047	down	Rattus norvegicus epidermal growth factor receptor (Egfr), mRNA.
Pgf	0,006649838	1,4787107	up	1,6677073	up	Rattus norvegicus placental growth factor (Pgf), mRNA.
Hif1a	0,006649838	1,0591784	up	-1,188186	down	Rattus norvegicus hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (Hif1a), mRNA.
Métabolisme des lipides						
Fabp3	0,019874698	1,0420002	up	-1,1501988	down	Rattus norvegicus fatty acid binding protein 3, muscle and heart (Fabp3), mRNA.
Fabp4	0,006649838	1,6887829	up	1,6402255	up	Rattus norvegicus fatty acid binding protein 4, adipocyte (Fabp4), mRNA.
Lipg	0,023673533	1,1156315	up	1,3541005	up	Rattus norvegicus lipase, endothelial (Lipg), mRNA.
Lpl	0,006649838	-1,1107513	down	1,0890875	up	Rattus norvegicus lipoprotein lipase (Lpl), mRNA.
Pla2g10	0,006649838	2,2885466	up	2,1634047	up	Rattus norvegicus phospholipase A2, group X (Pla2g10), mRNA.
Pla2g12a_predicted	0,006649838	-1,3155173	down	1,0558263	up	PREDICTED: Rattus norvegicus phospholipase A2, group XIA (predicted) (Pla2g12a_predicted), mRNA.
Pla2g15	0,006649838	-1,7587742	down	-2,0760388	down	Rattus norvegicus phospholipase A2, group XV (Pla2g15), mRNA.
Pla2g4b_predicted	0,006649838	1,0535443	up	1,1737608	up	PREDICTED: Rattus norvegicus phospholipase A2, group IVB (cytosolic) (predicted) (Pla2g4b_predicted), mRNA.
Transporteurs de glucose						
Slc2a2	0,006649838	-2,09386	down	-2,1454656	down	PREDICTED: Rattus norvegicus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (Slc2a2), mRNA.
Slc2a4	0,006649838	1,1119497	up	1,181064	up	Rattus norvegicus solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (Slc2a4), mRNA.
Slc2a5	0,006649838	1,2619112	up	1,2386295	up	Rattus norvegicus solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5 (Slc2a5), mRNA.
Epigénétique						
Dnmt3a	0,027439188	-1,0319487	down	1,1452997	up	Rattus norvegicus DNA methyltransferase 3A (Dnmt3a), transcript variant 2, mRNA.
Dnmt3b	0,006649838	1,4819647	up	1,6456349	up	Rattus norvegicus DNA methyltransferase 3B (Dnmt3b), mRNA.
Voie de la sérotonine						
Htr2b	0,006649838	1,2804278	up	1,2625604	up	Rattus norvegicus 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B (Htr2b), mRNA.
Htr1d	0,006649838	2,3552942	up	2,2024763	up	Rattus norvegicus 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D (Htr1d), mRNA.
SRAA						
Ace2	0,006649838	-1,7071228	down	-1,6648638	down	Rattus norvegicus angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2 (Ace2), mRNA.
Agtr1a	0,006649838	-1,3331302	down	-1,3700275	down	Rattus norvegicus angiotensin II receptor, type 1 (AT1A) (Agtr1a), mRNA.
Autres						
Bmp1	0,006649838	1,707451	up	1,695157	up	PREDICTED: Rattus norvegicus bone morphogenetic protein 1, transcript variant 2 (Bmp1), mRNA.
Pr8a2	0,006649838	5,515411	up	4,094755	up	Rattus norvegicus prolactin family 8, subfamily a, member 2 (Pr8a2), mRNA.
Adipoq	0,006649838	1,6637645	up	1,327663	up	Rattus norvegicus adiponectin, C1Q and collagen domain containing (Adipoq), mRNA.
Ucp2	0,011473766	1,1561689	up	1,2116923	up	Rattus norvegicus uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (Ucp2), mRNA.
Npy	0,006649838	-1,1128902	down	1,3090957	up	Rattus norvegicus neuropeptide Y (Npy), mRNA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Anonymous** 1990 Diabetes care and research in Europe: the Saint Vincent declaration *Diabet Med* 7:360
2. **Anonymous** 2009 Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations with neonatal anthropometrics *Diabetes* 58:453-459
3. **Abi KC, Travert F, Fetita S, Rouzet F, Porcher R, Riveline JP, Hadjadj S, Larger E, Roussel R, Vexiau P, Le GD, Gautier JF, Marre M** 2010 Fetal exposure to maternal type 1 diabetes is associated with renal dysfunction at adult age. *Diabetes* 59:2631-2636
4. **Aceti A, Santhakumaran S, Logan KM, Philipps LH, Prior E, Gale C, Hyde MJ, Modi N** 2012 The diabetic pregnancy and offspring blood pressure in childhood: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 55:3114-3127
5. **Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC** 2002 Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol* 250:358-373
6. **Agrogiannis GD, Sifakis S, Patsouris ES, Konstantinidou AE** 2014 Insulin-like growth factors in embryonic and fetal growth and skeletal development (Review). *Mol Med Rep* 10:579-584
7. **Ain R, Dai G, Dunmore JH, Godwin AR, Soares MJ** 2004 A prolactin family paralog regulates reproductive adaptations to a physiological stressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16543-16548
8. **Ain R, Konno T, Canham LN, Soares MJ** 2006 Phenotypic analysis of the rat placenta. *Methods Mol Med* 121:295-313
9. **Ain R, Tash JS, Soares MJ** 2003 Prolactin-like protein-A is a functional modulator of natural killer cells at the maternal-fetal interface. *Mol Cell Endocrinol* 204:65-74
10. **Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi S, Farhangi A, Verdi AA, Mofidian SM, Rad BL** 2007 Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem* 22:60-64
11. **Akerman F, Lei ZM, Rao CV** 2002 Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol* 16:299-306
12. **Akude E, Zhrebetskaya E, Chowdhury SK, Smith DR, Dobrowsky RT, Fernyhough P** 2011 Diminished superoxide generation is associated with respiratory chain dysfunction and changes in the mitochondrial proteome of sensory neurons from diabetic rats. *Diabetes* 60:288-297
13. **Alam SM, Ain R, Konno T, Ho-Chen JK, Soares MJ** 2006 The rat prolactin gene family locus: species-specific gene family expansion. *Mamm Genome* 17:858-877

14. **Alam SM, Konno T, Dai G, Lu L, Wang D, Dunmore JH, Godwin AR, Soares MJ** 2007 A uterine decidual cell cytokine ensures pregnancy-dependent adaptations to a physiological stressor. *Development* 134:407-415
15. **Alam SM, Konno T, Sahgal N, Lu L, Soares MJ** 2008 Decidual cells produce a heparin-binding prolactin family cytokine with putative intrauterine regulatory actions. *J Biol Chem* 283:18957-18968
16. **Alsat A, Malassin A, Tarrade A, Merviel P, Evain-Brion D** 1999 Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste. *medecine et sciences* 15:1236-1243
17. **Angiolini E, Fowden A, Coan P, Sandovici I, Smith P, Dean W, Burton G, Tycko B, Reik W, Sibley C, Constancia M** 2006 Regulation of placental efficiency for nutrient transport by imprinted genes. *Placenta* 27 Suppl A:S98-102
18. **Aplin J** 2000 Maternal influences on placental development. *Semin Cell Dev Biol* 11:115-125
19. **Arany E, Hill DJ** 1998 Fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 mRNA expression and peptide localization in placentae from normal and diabetic pregnancies. *Placenta* 19:133-142
20. **Ashworth CJ, Hoggard N, Thomas L, Mercer JG, Wallace JM, Lea RG** 2000 Placental leptin. *Rev Reprod* 5:18-24
21. **Assogba FG, Couchoud C, Hannedouche T, Villar E, Frimat L, Fagot-Campagna A, Jacquelinet C, Stengel B** 2014 Trends in the epidemiology and care of diabetes mellitus-related end-stage renal disease in France, 2007-2011. *Diabetologia* 57:718-728
22. **Astwood EB, Greep RO** 2014 corpus luteum stimulating substance in the rat placenta. *Proc Soc Exp Biol Med* 38:713-716
23. **Aye IL, Powell TL, Jansson T** 2013 Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? *Placenta* 34 Suppl:S40-S45
24. **Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS** 1993 Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133:935-938
25. **Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM** 1999 PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-595
26. **Barker DJ** 1997 Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* 13:807-813
27. **Barker DJ** 1993 The intrauterine origins of cardiovascular disease. *Acta Paediatr Suppl* 82 Suppl 391:93-99

28. **Barker DJ** 2007 The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261:412-417
29. **Barker DJ, Osmond C** 1986 Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1:1077-1081
30. **Barlic J, Murphy PM** 2007 An oxidized lipid-peroxisome proliferator-activated receptor gamma-chemokine pathway in the regulation of macrophage-vascular smooth muscle cell adhesion. *Trends Cardiovasc Med* 17:269-274
31. **Barnea ER, Neubrun D, Shurtz-Swirski R** 1993 Effect of insulin on human chorionic gonadotrophin secretion by placental explants. *Hum Reprod* 8:858-862
32. **Baumann MU, Deborde S, Illsley NP** 2002 Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 19:13-22
33. **Beaven SW, Tontonoz P** 2006 Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. *Annu Rev Med* 57:313-329
34. **Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D** 2009 Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 373:1773-1779
35. **Beltrand J, Levy-Marchal C** 2008 Pathophysiology of insulin resistance in subjects born small for gestational age. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22:503-515
36. **Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW** 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639-669
37. **Benaitreau D, Dos SE, Leneveu MC, Alfaidy N, Feige JJ, De MP, Pecquery R, Dieudonne MN** 2010 Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. *J Endocrinol* 207:45-53
38. **Bentzien F, Struman I, Martini JF, Martial J, Weiner R** 2001 Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Res* 61:7356-7362
39. **Berndt S, Perrier dS, Blacher S, Pequeux C, Lorquet S, Munaut C, Applanat M, Herve MA, Lamande N, Corvol P, van den BF, Frankenne F, Poutanen M, Huhtaniemi I, Geenen V, Noel A, Foidart JM** 2006 Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium. *FASEB J* 20:2630-2632
40. **Billionnet C, Weil C, Ricordeau P, Alla F, Mitanchez D, Hartemann A, Jacqueminet S** 2014 Diabète prégestationnel (type 1 et 2) et grossesse : données de la population française en 2011. *Congrès SFD 2014* 061 *Diab Metab* 40 (S1)15

41. **Biron-Shental T, Schaiff WT, Ratajczak CK, Bildirici I, Nelson DM, Sadovsky Y** 2007 Hypoxia regulates the expression of fatty acid-binding proteins in primary term human trophoblasts. *Am J Obstet Gynecol* 197:516
42. **Bobadilla RA, van BR, Vercruyssen L, Pijnenborg R, Verhaeghe J** 2010 Placental effects of systemic tumour necrosis factor-alpha in an animal model of gestational diabetes mellitus. *Placenta* 31:1057-1063
43. **Boileau P, Mrejen C, Girard J, Hauguel-De MS** 1995 Overexpression of GLUT3 placental glucose transporter in diabetic rats. *J Clin Invest* 96:309-317
44. **Bonaldi C, Vernay M, Roudier C, Salanave B, Oleko A, Malon A, Castetbon K, Fagot-Campagna A** 2011 A first national prevalence estimate of diagnosed and undiagnosed diabetes in France in 18- to 74-year-old individuals: the French Nutrition and Health Survey 2006/2007. *Diabet Med* 28:583-589
45. **Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR** 2005 Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 115:e290-e296
46. **Borbely AU, Sandri S, Fernandes IR, Prado KM, Cardoso EC, Correa-Silva S, Albuquerque R, Knofler M, Beltrao-Braga P, Campa A, Bevilacqua E** 2014 The term basal plate of the human placenta as a source of functional extravillous trophoblast cells. *Reprod Biol Endocrinol* 12:7
47. **Boulot P, Chabbert-Buffet N, d'Ercole C, Floriot M, Fontaine P, Fournier A, Gillet JY, Gin H, Grandperret-Vauthier S, Geudj AM, Guionnet B, Hauguel-de-Mouzon S, Hieronimus S, Hoffet M, Jullien D, Lamotte MF, Lejeune V, Lepercq J, Lorenzi F, Mares P, Miton A, Penfornis A, Pfister B, Renard E, Rodier M, Roth P, Sery GA, Timsit J, Valat AS, Vambergue A, Verrier-Mine O** 2003 French multicentric survey of outcome of pregnancy in women with pregestational diabetes. *Diabetes Care* 26:2990-2993
48. **Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD** 2002 Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta* 23:257-273
49. **Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, Alfaidy N** 2010 Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 21:2832-2843
50. **Bunt JC, Tataranni PA, Salbe AD** 2005 Intrauterine exposure to diabetes is a determinant of hemoglobin A(1)c and systolic blood pressure in pima Indian children. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3225-3229
51. **Burton GJ** 2009 Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat* 215:27-35

52. **Callec R, Perdriolle-Galet E, Sery GA, Lamy C, Floriot M, Fresson J, Morel O** 2013 [Type 2 diabetes and pregnancy: Epidemiology and obstetrical consequences. A 97 women continuous series.]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*
53. **Capobianco E, Jawerbaum A, Romanini MC, White V, Pustovrh C, Higa R, Martinez N, Mugnaini MT, Sonez C, Gonzalez E** 2005 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) levels in term placental tissues from control and diabetic rats: modulatory effects of a PPARgamma agonist on nitridergic and lipid placental metabolism. *Reprod Fertil Dev* 17:423-433
54. **Capobianco E, Martinez N, Higa R, White V, Jawerbaum A** 2008 The effects of maternal dietary treatments with natural PPAR ligands on lipid metabolism in fetuses from control and diabetic rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:191-199
55. **Capparuccia L, Marzioni D, Giordano A, Fazioli F, De NM, Busso N, Todros T, Castellucci M** 2002 PPARgamma expression in normal human placenta, hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Mol Hum Reprod* 8:574-579
56. **Carlino C, Stabile H, Morrone S, Bulla R, Soriani A, Agostinis C, Bossi F, Mocci C, Sarazani F, Tedesco F, Santoni A, Gismondi A** 2008 Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood* 111:3108-3115
57. **Carpenter MW, Coustan DR** 1982 Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 144:768-773
58. **Castellucci M, De MR, Meisser A, Canello R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P** 2000 Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 6:951-958
59. **Catalano PM, Farrell K, Thomas A, Huston-Presley L, Mencin P, de Mouzon SH, Amini SB** 2009 Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. *Am J Clin Nutr* 90:1303-1313
60. **Catalano PM, Kirwan JP** 2001 Maternal factors that determine neonatal size and body fat. *Curr Diab Rep* 1:71-77
61. **Catalano PM, Thomas A, Huston-Presley L, Amini SB** 2003 Increased fetal adiposity: a very sensitive marker of abnormal in utero development. *Am J Obstet Gynecol* 189:1698-1704
62. **CERRUTI RA, LYONS WR** 1960 Mammogenic activities of the midgestational mouse placenta. *Endocrinology* 67:884-887
63. **Cetin I, de Santis MS, Taricco E, Radaelli T, Teng C, Ronzoni S, Spada E, Milani S, Pardi G** 2005 Maternal and fetal amino acid concentrations in normal

pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 192:610-617

64. **Challier JC, Uzan Serge** 2003 Le placenta humain et ses pathologies; l'oxygène en question. *medecine et sciences* 19:1111-1120
65. **Chapman HA** 1997 Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 9:714-724
66. **Chardonens D, Cameo P, Aubert ML, Pralong FP, Islami D, Campana A, Gaillard RC, Bischof P** 1999 Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion. *Mol Hum Reprod* 5:1077-1082
67. **Charles MA, Eschwege E, Basdevant A** 2008 Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006. *Obesity (Silver Spring)* 16:2182-2186
68. **Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinis RE, Seeburg PH** 1989 The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 4:479-497
69. **Chen H, Chen H, Wu Y, Liu B, Li Z, Wang Z** 2014 Adiponectin exerts antiproliferative effect on human placenta via modulation of the JNK/c-Jun pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 7:2894-2904
70. **Christian M, Marangos P, Mak I, McVey J, Barker F, White J, Brosens JJ** 2001 Interferon-gamma modulates prolactin and tissue factor expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 142:3142-3151
71. **Cianfarani S, Germani D, Branca F** 1999 Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 81:F71-F73
72. **Cianfarani S, Germani D, Rossi P, Rossi L, Germani A, Ossicini C, Zuppa A, Argiro G, Holly JM, Branca F** 1998 Intrauterine growth retardation: evidence for the activation of the insulin-like growth factor (IGF)-related growth-promoting machinery and the presence of a cation-independent IGF binding protein-3 proteolytic activity by two months of life. *Pediatr Res* 44:374-380
73. **Cisse O, Fajardy I, ckes-Coopman A, Moitrot E, Montel V, Deloof S, Rousseaux J, Vieau D, Laborie C** 2013 Mild gestational hyperglycemia in rat induces fetal overgrowth and modulates placental growth factors and nutrient transporters expression. *PLoS One* 8:e64251
74. **Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, Damm P** 2008 High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care* 31:340-346

75. **Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC** 2006 Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn* 235:3280-3294
76. **Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ** 2004 Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod* 70:1806-1813
77. **Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Bischof P** 2006 Involvement of MAPK pathway in TNF-alpha-induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 12:225-232
78. **Cole LA** 1997 Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem* 43:2233-2243
79. **Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Danni O, Thiemermann C, Fantozzi R** 2006 Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 530:70-80
80. **Colstrup M, Mathiesen ER, Damm P, Jensen DM, Ringholm L** 2013 Pregnancy in women with type 1 diabetes: have the goals of St. Vincent declaration been met concerning foetal and neonatal complications? *J Matern Fetal Neonatal Med* 26:1682-1686
81. **Corbacho AM, Martinez de la EG, Clapp C** 2002 Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol* 173:219-238
82. **Cottrell EC, Ozanne SE** 2007 Developmental programming of energy balance and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc* 66:198-206
83. **Cronier L, Guibourdenche J, Niger C, Malassine A** 1999 Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 20:669-676
84. **Cross JC, Werb Z, Fisher SJ** 1994 Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 266:1508-1518
85. **Cundy T, Gamble G, Townend K, Henley PG, MacPherson P, Roberts AB** 2000 Perinatal mortality in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 17:33-39
86. **Dabelea D, Hanson RL, Lindsay RS, Pettitt DJ, Imperatore G, Gabir MM, Roumain J, Bennett PH, Knowler WC** 2000 Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* 49:2208-2211
87. **Dabelea D, Pettitt DJ** 2001 Intrauterine diabetic environment confers risks for type 2 diabetes mellitus and obesity in the offspring, in addition to genetic susceptibility. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14:1085-1091

88. **Demir R, Erben T** 1984 Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anat (Basel)* 119:18-26
89. **Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE** 2005 Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:421-439
90. **Desforges M, Mynett KJ, Jones RL, Greenwood SL, Westwood M, Sibley CP, Glazier JD** 2009 The SNAT4 isoform of the system A amino acid transporter is functional in human placental microvillous plasma membrane. *J Physiol* 587:61-72
91. **Desvergne B, Michalik L, Wahli W** 2006 Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 86:465-514
92. **Diouf I, Charles MA, Ducimetiere P, Basdevant A, Eschwege E, Heude B** 2010 Evolution of obesity prevalence in France: an age-period-cohort analysis. *Epidemiology* 21:360-365
93. **Dong M, Ding G, Zhou J, Wang H, Zhao Y, Huang H** 2008 The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules--a proteomic analysis. *Cell Physiol Biochem* 21:463-472
94. **Duttaroy AK** 2009 Transport of fatty acids across the human placenta: a review. *Prog Lipid Res* 48:52-61
95. **Ericsson A, Hamark B, Powell TL, Jansson T** 2005 Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Hum Reprod* 20:521-530
96. **Evers IM, de Valk HW, Visser GH** 2004 Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *BMJ* 328:915
97. **Eyal O, Jomain JB, Kessler C, Goffin V, Handwerger S** 2007 Autocrine prolactin inhibits human uterine decidualization: a novel role for prolactin. *Biol Reprod* 76:777-783
98. **Fajardy I** 2009 Conséquences placentaires associées au diabète et macrosomie fœtale. *medecine et nutrition* 45:39-48
99. **Feng Q, Liu Y, Liu K, Byrne S, Liu G, Wang X, Li Z, Ockleford CD** 2000 Expression of urokinase, plasminogen activator inhibitors and urokinase receptor in pregnant rhesus monkey uterus during early placentation. *Placenta* 21:184-193
100. **Ferraris J, Radl DB, Zarate S, Jaita G, Eijo G, Zaldivar V, Clapp C, Seilicovich A, Pisera D** 2011 N-terminal prolactin-derived fragments, vaso-inhibins, are proapoptotic and antiproliferative in the anterior pituitary. *PLoS One* 6:e21806

101. **Fetita LS, Sobngwi E, Serradas P, Calvo F, Gautier JF** 2006 Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3718-3724
102. **Fisher SJ, Damsky CH** 1993 Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol* 4:183-188
103. **Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ** 2004 The embryo and its future. *Biol Reprod* 71:1046-1054
104. **Forsdahl A** 1977 Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med* 31:91-95
105. **Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D** 2007 PPARs and the placenta. *Placenta* 28:65-76
106. **Franke K, Harder T, Aerts L, Melchior K, Fahrenkrog S, Rodekamp E, Ziska T, Van Assche FA, Dudenhausen JW, Plagemann A** 2005 'Programming' of orexigenic and anorexigenic hypothalamic neurons in offspring of treated and untreated diabetic mother rats. *Brain Res* 1031:276-283
107. **Frayling TM, Evans JC, Bulman MP, Pearson E, Allen L, Owen K, Bingham C, Hannemann M, Shepherd M, Ellard S, Hattersley AT** 2001 beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 50 Suppl 1:S94-100
108. **Friedrichsen BN, Richter HE, Hansen JA, Rhodes CJ, Nielsen JH, Billestrup N, Moldrup A** 2003 Signal transducer and activator of transcription 5 activation is sufficient to drive transcriptional induction of cyclin D2 gene and proliferation of rat pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 17:945-958
109. **Fruhbeck G** 2006 The Sir David Cuthbertson Medal Lecture. Hunting for new pieces to the complex puzzle of obesity. *Proc Nutr Soc* 65:329-347
110. **Gaither K, Quraishi AN, Illsley NP** 1999 Diabetes alters the expression and activity of the human placental GLUT1 glucose transporter. *J Clin Endocrinol Metab* 84:695-701
111. **Gamborg M, Byberg L, Rasmussen F, Andersen PK, Baker JL, Bengtsson C, Canoy D, Droyvold W, Eriksson JG, Forsen T, Gunnarsdottir I, Jarvelin MR, Koupil I, Lapidus L, Nilsen TI, Olsen SF, Schack-Nielsen L, Thorsdottir I, Tuomainen TP, Sorensen TI** 2007 Birth weight and systolic blood pressure in adolescence and adulthood: meta-regression analysis of sex- and age-specific results from 20 Nordic studies. *Am J Epidemiol* 166:634-645
112. **Gardosi J, Mongelli M, Wilcox M, Chang A** 1995 An adjustable fetal weight standard. *Ultrasound Obstet Gynecol* 6:168-174

113. **Ge G, Fernandez CA, Moses MA, Greenspan DS** 2007 Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10010-10015
114. **Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE** 1994 Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 8:356-373
115. **Gicquel C, Le BY** 2006 Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 65 Suppl 3:28-33
116. **Giroux S, Tremblay M, Bernard D, Cardin-Girard JF, Aubry S, Larouche L, Rousseau S, Huot J, Landry J, Jeannotte L, Charron J** 1999 Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol* 9:369-372
117. **Glinianaia SV, Tennant PW, Bilous RW, Rankin J, Bell R** 2012 HbA(1c) and birthweight in women with pre-conception type 1 and type 2 diabetes: a population-based cohort study. *Diabetologia* 55:3193-3203
118. **Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS** 2009 Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nat Rev Endocrinol* 5:401-408
119. **Goldman S, Shalev E** 2006 A proposed mechanism for progesterone regulation of trophoblast MMP2 transcription independent of classical progesterone response elements on its promoter. *J Exp Clin Assist Reprod* 3:4
120. **Golob EK, Rishi S, Becker KL, Moore C, Shah N** 1970 Effect of streptozotocin-induced diabetes on pancreatic insulin content of the fetus. *Diabetes* 19:610-613
121. **Gonzalez C, Parra A, Ramirez-Peredo J, Garcia C, Rivera JC, Macotela Y, Aranda J, Lemini M, Arias J, Ibarguengoitia F, de la Escalera GM, Clapp C** 2007 Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest* 87:1009-1017
122. **Gordon M, Landon MB, Samuels P, Hissrich S, Gabbe SG** 1996 Perinatal outcome and long-term follow-up associated with modern management of diabetic nephropathy. *Obstet Gynecol* 87:401-409
123. **Gross GA, Solenberger T, Philpott T, Holcomb WL, Jr., Landt M** 1998 Plasma leptin concentrations in newborns of diabetic and nondiabetic mothers. *Am J Perinatol* 15:243-247
124. **Guibourdenche J, Fournier T, Malassine A, Evain-Brion D** 2009 Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochem Cytobiol* 47:S35-S40

125. **Hadar E, Hod M** 2010 Establishing consensus criteria for the diagnosis of diabetes in pregnancy following the HAPO study. *Ann N Y Acad Sci* 1205:88-93
126. **Haggarty P** 2010 Fatty acid supply to the human fetus. *Annu Rev Nutr* 30:237-255
127. **Hales CN, Barker DJ** 1992 Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35:595-601
128. **Hales CN, Barker DJ** 2001 The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60:5-20
129. **Hallast P, Nagirnaja L, Margus T, Laan M** 2005 Segmental duplications and gene conversion: Human luteinizing hormone/chorionic gonadotropin beta gene cluster. *Genome Res* 15:1535-1546
130. **Han VK, Carter AM** 2000 Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals. *Placenta* 21:289-305
131. **Han VK, Matsell DG, Delhanty PJ, Hill DJ, Shimasaki S, Nygard K** 1996 IGF-binding protein mRNAs in the human fetus: tissue and cellular distribution of developmental expression. *Horm Res* 45:160-166
132. **Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T** 2007 Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 28:175-184
133. **Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P** 1997 Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 47:101-106
134. **Hattersley AT, Tooke JE** 1999 The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *Lancet* 353:1789-1792
135. **Henson MC, Swan KF, O'Neil JS** 1998 Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 92:1020-1028
136. **Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, Ortega H** 2006 Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res* 65 Suppl 3:59-64
137. **Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N, Genbecev-Krtolica O, Mavrogianis P, Ferrer K, Kruessel J, Fazleabas AT, Fisher SJ, Giudice LC** 2007 Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod* 76:102-117
138. **Hiden U, Glitzner E, Hartmann M, Desoye G** 2009 Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *J Anat* 215:60-68

139. **Hidden U, Glitznier E, Ivanisevic M, Djelmis J, Wadsack C, Lang U, Desoye G** 2008 MT1-MMP expression in first-trimester placental tissue is upregulated in type 1 diabetes as a result of elevated insulin and tumor necrosis factor-alpha levels. *Diabetes* 57:150-157
140. **Hidden U, Lang I, Ghaffari-Tabrizi N, Gauster M, Lang U, Desoye G** 2009 Insulin action on the human placental endothelium in normal and diabetic pregnancy. *Curr Vasc Pharmacol* 7:460-466
141. **Hidden U, Lassance L, Tabrizi NG, Miedl H, Tam-Amersdorfer C, Cetin I, Lang U, Desoye G** 2012 Fetal insulin and IGF-II contribute to gestational diabetes mellitus (GDM)-associated up-regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in the human feto-placental endothelium. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3613-3621
142. **Hidden U, Maier A, Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Wadsack C, Lang I, Dohr G, Desoye G** 2006 Insulin control of placental gene expression shifts from mother to foetus over the course of pregnancy. *Diabetologia* 49:123-131
143. **Higa R, Gonzalez E, Pustovrh MC, White V, Capobianco E, Martinez N, Jawerbaum A** 2007 PPARdelta and its activator PGI2 are reduced in diabetic embryopathy: involvement of PPARdelta activation in lipid metabolic and signalling pathways in rat embryo early organogenesis. *Mol Hum Reprod* 13:103-110
144. **Higgins MF, Russell NM, Brazil DP, Firth RG, McAuliffe FM** 2013 Fetal and maternal leptin in pre-gestational diabetic pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 120:169-172
145. **Highman TJ, Friedman JE, Huston LP, Wong WW, Catalano PM** 1998 Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 178:1010-1015
146. **Hihl AK, Michalik L, Wahli W** 2002 PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci* 59:790-798
147. **Hillier TA, Pedula KL, Schmidt MM, Mullen JA, Charles MA, Pettitt DJ** 2007 Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care* 30:2287-2292
148. **Hills FA, Elder MG, Chard T, Sullivan MH** 2004 Regulation of human villous trophoblast by insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding protein-1. *J Endocrinol* 183:487-496
149. **Hinck L, Thissen JP, Pampfer S, De HR** 2003 Effect of high concentrations of glucose on differentiation of rat trophoblast cells in vitro. *Diabetologia* 46:276-283

150. **Holemans K, Aerts L, Van Assche FA** 2003 Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig* 10:392-399
151. **Holstad M, Sandler S** 1999 Prolactin protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *J Endocrinol* 163:229-234
152. **Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K** 1997 Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J* 16:6926-6935
153. **Huang JR, Tseng L, Bischof P, Janne OA** 1987 Regulation of prolactin production by progesterin, estrogen, and relaxin in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 121:2011-2017
154. **Ibanez L, de ZF** 2006 Puberty and prenatal growth. *Mol Cell Endocrinol* 254-255:22-25
155. **Iciek R, Wender-Ozegowska E, Zawiejska A, Mikolajczak P, Mrozkiewicz PM, Pietryga M, Brazert J** 2013 Placental leptin and its receptor genes expression in pregnancies complicated by type 1 diabetes. *J Physiol Pharmacol* 64:579-585
156. **Ingraham HA, Flynn SE, Voss JW, Albert VR, Kapiloff MS, Wilson L, Rosenfeld MG** 1990 The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interactions. *Cell* 61:1021-1033
157. **International Diabetes Federation (IDF)** 2011 *IDF Diabetes Atlas-5th ed*
158. **Islami D, Bischof P, Chardonens D** 2003 Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol Hum Reprod* 9:395-398
159. **Itoh K, Hiromori Y, Kato N, Yoshida I, Itoh N, Ike M, Nagase H, Tanaka K, Nakanishi T** 2009 Placental steroidogenesis in rats is independent of signaling pathways induced by retinoic acids. *Gen Comp Endocrinol* 163:285-291
160. **Jabbour HN, Critchley HO** 2001 Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction* 121:197-205
161. **Jabbour HN, Critchley HO, Boddy SC** 1998 Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2545-2553
162. **Jansson T** 2001 Amino acid transporters in the human placenta. *Pediatr Res* 49:141-147

163. **Jansson T, Ylven K, Wennergren M, Powell TL** 2002 Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction. *Placenta* 23:392-399
164. **Jauniaux E, Burton GJ** 2006 Villous histomorphometry and placental bed biopsy investigation in Type I diabetic pregnancies. *Placenta* 27:468-474
165. **Jawerbaum A, Capobianco E, Pustovrh C, White V, Baier M, Salzberg S, Pesaresi M, Gonzalez E** 2004 Influence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by its endogenous ligand 15-deoxy Delta12,14 prostaglandin J2 on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women. *Mol Hum Reprod* 10:671-676
166. **Jawerbaum A, Higa R, White V, Capobianco E, Pustovrh C, Sinner D, Martinez N, Gonzalez E** 2005 Peroxynitrites and impaired modulation of nitric oxide concentrations in embryos from diabetic rats during early organogenesis. *Reproduction* 130:695-703
167. **Jawerbaum A, White V** 2010 Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocr Rev* 31:680-701
168. **Jensen DM, Damm P, Ovesen P, Molsted-Pedersen L, Beck-Nielsen H, Westergaard JG, Moeller M, Mathiesen ER** 2010 Microalbuminuria, preeclampsia, and preterm delivery in pregnant women with type 1 diabetes: results from a nationwide Danish study. *Diabetes Care* 33:90-94
169. **Jirkovska M, Kucera T, Kalab J, Jadrnicek M, Niedobova V, Janacek J, Kubinova L, Moravcova M, Zizka Z, Krejci V** 2012 The branching pattern of villous capillaries and structural changes of placental terminal villi in type 1 diabetes mellitus. *Placenta* 33:343-351
170. **Joerink M, Rindsjo E, van RB, Alm J, Papadogiannakis N** 2011 Placental macrophage (Hofbauer cell) polarization is independent of maternal allergen-sensitization and presence of chorioamnionitis. *Placenta* 32:380-385
171. **Jones HN, Jansson T, Powell TL** 2010 Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino Acid transport in human primary trophoblast cells. *Diabetes* 59:1161-1170
172. **Kappen C, Kruger C, MacGowan J, Salbaum JM** 2012 Maternal diet modulates placenta growth and gene expression in a mouse model of diabetic pregnancy. *PLoS One* 7:e38445
173. **Karanam VL, Page NM, nim-Nyame N** 2014 Maternal tissue blood flow and oxygen saturation in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 178:148-152
174. **Katsuda Y, Ohta T, Miyajima K, Kemmochi Y, Sasase T, Tong B, Shinohara M, Yamada T** 2014 Diabetic complications in obese type 2 diabetic rat models. *Exp Anim* 63:121-132

175. **Kaufmann P, Black S, Huppertz B** 2003 Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69:1-7
176. **Kazantzis M, Stahl A** 2012 Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta* 1821:852-857
177. **Kelly PA, Djiane J, Banville D, Ali S, Edery M, Rozakis M** 1991 The growth hormone/prolactin receptor gene family. *Oxf Surv Eukaryot Genes* 7:29-50
178. **Khurana S, Kuns R, Ben-Jonathan N** 1999 Heparin-binding property of human prolactin: a novel aspect of prolactin biology. *Endocrinology* 140:1026-1029
179. **Kim SY, England JL, Sharma JA, Njoroge T** 2011 Gestational diabetes mellitus and risk of childhood overweight and obesity in offspring: a systematic review. *Exp Diabetes Res* 2011:541308
180. **Kirwan JP, Huston-Presley L, Kalhan SC, Catalano PM** 2001 Clinically useful estimates of insulin sensitivity during pregnancy: validation studies in women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 24:1602-1607
181. **Kline JB, Roehrs H, Clevenger CV** 1999 Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J Biol Chem* 274:35461-35468
182. **Knopp RH, Warth MR, Charles D, Childs M, Li JR, Mabuchi H, Van Allen MI** 1986 Lipoprotein metabolism in pregnancy, fat transport to the fetus, and the effects of diabetes. *Biol Neonate* 50:297-317
183. **Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG** 2012 Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med* 2012:918267
184. **Krishnaveni GV, Hill JC, Leary SD, Veena SR, Saperia J, Saroja A, Karat SC, Fall CH** 2005 Anthropometry, glucose tolerance, and insulin concentrations in Indian children: relationships to maternal glucose and insulin concentrations during pregnancy. *Diabetes Care* 28:2919-2925
185. **Krupinski P, Chickarmane V, Peterson C** 2011 Simulating the mammalian blastocyst--molecular and mechanical interactions pattern the embryo. *PLoS Comput Biol* 7:e1001128
186. **Kuhn DC, Crawford MA, Stuart MJ, Botti JJ, Demers LM** 1990 Alterations in transfer and lipid distribution of arachidonic acid in placentas of diabetic pregnancies. *Diabetes* 39:914-918
187. **Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Kodaka Y, Hirata A, Sakurai T, Bai H, Imakawa K, Nishi H, Isaka K, Nagai T, Nagao T, Tachikawa E** 2013 Regulation of decidualization in human endometrial stromal cells through

exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac). *Placenta* 34:212-221

188. **Lacroix MC, Guibourdenche J, Fournier T, Laurendeau I, Igout A, Goffin V, Pantel J, Tsatsaris V, Evain-Brion D** 2005 Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. *Endocrinology* 146:2434-2444
189. **Lacroix MC, Guibourdenche J, Frenedo JL, Muller F, Evain-Brion D** 2002 Human placental growth hormone--a review. *Placenta* 23 Suppl A:S87-S94
190. **Lager S, Powell TL** 2012 Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy* 2012:179827
191. **Langer O, Mazze R** 1988 The relationship between large-for-gestational-age infants and glycemic control in women with gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 159:1478-1483
192. **Larque E, Demmelmair H, Klingler M, De JS, Bondy B, Koletzko B** 2006 Expression pattern of fatty acid transport protein-1 (FATP-1), FATP-4 and heart-fatty acid binding protein (H-FABP) genes in human term placenta. *Early Hum Dev* 82:697-701
193. **Leanos-Miranda A, Campos-Galicia I, Ramirez-Valenzuela KL, Chinolla-Arellano ZL, Isordia-Salas I** 2013 Circulating angiogenic factors and urinary prolactin as predictors of adverse outcomes in women with preeclampsia. *Hypertension* 61:1118-1125
194. **Lee CH, Olson P, Evans RM** 2003 Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 144:2201-2207
195. **Lenzen S** 2008 The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51:216-226
196. **Lepercq J, Taupin P, Dubois-Laforgue D, Duranteau L, Lahlou N, Boitard C, Landais P, Hauguel-De MS, Timsit J** 2001 Heterogeneity of fetal growth in type 1 diabetic pregnancy. *Diabetes Metab* 27:339-344
197. **Li HP, Chen X, Li MQ** 2013 Gestational diabetes induces chronic hypoxia stress and excessive inflammatory response in murine placenta. *Int J Clin Exp Pathol* 6:650-659
198. **Li MY, Lee TW, Yim AP, Chen GG** 2006 Function of PPARgamma and its ligands in lung cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 43:183-202
199. **Liang XD, Guo YY, Sun M, Ding Y, Wang N, Yuan L, De W** 2011 Streptozotocin-induced expression of Ngn3 and Pax4 in neonatal rat pancreatic alpha-cells. *World J Gastroenterol* 17:2812-2820

200. **Lindegaard ML, Olivecrona G, Christoffersen C, Kratky D, Hannibal J, Petersen BL, Zechner R, Damm P, Nielsen LB** 2005 Endothelial and lipoprotein lipases in human and mouse placenta. *J Lipid Res* 46:2339-2346
201. **Ling C, Del GS, Lupi R, Ronn T, Granhall C, Luthman H, Masiello P, Marchetti P, Groop L, Del PS** 2008 Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia* 51:615-622
202. **Linnemann K, Malek A, Sager R, Blum WF, Schneider H, Fusch C** 2000 Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4298-4301
203. **Lopez-Soldado I, Herrera E** 2003 Different diabetogenic response to moderate doses of streptozotocin in pregnant rats, and its long-term consequences in the offspring. *Exp Diabetes Res* 4:107-118
204. **Loukovaara S, Kaaja RJ, Koistinen RA** 2005 Cord serum insulin-like growth factor binding protein-1 and -3: effect of maternal diabetes and relationships to fetal growth. *Diabetes Metab* 31:163-167
205. **Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F** 2007 Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 5:6
206. **Maaskant RA, Bogic LV, Gilger S, Kelly PA, Bryant-Greenwood GD** 1996 The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 81:396-405
207. **MacLeod JN, Liebhaber SA, MacGillivray MH, Cooke NE** 1991 Identification of a splice-site mutation in the human growth hormone-variant gene. *Am J Hum Genet* 48:1168-1174
208. **Macotela Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeno C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martinez de la EG, Clapp C** 2006 Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* 119:1790-1800
209. **Maffeis C, Moghetti P, Vettor R, Lombardi AM, Vecchini S, Tato L** 1999 Leptin concentration in newborns' cord blood: relationship to gender and growth-regulating hormones. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:943-947
210. **Magarinos MP, Sanchez-Margalet V, Kotler M, Calvo JC, Varone CL** 2007 Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol Reprod* 76:203-210
211. **Magnusson AL, Waterman IJ, Wennergren M, Jansson T, Powell TL** 2004 Triglyceride hydrolase activities and expression of fatty acid binding proteins in the human placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4607-4614

212. **Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion D** 2010 Trisomy 21- affected placentas highlight prerequisite factors for human trophoblast fusion and differentiation. *Int J Dev Biol* 54:475-482
213. **Mandelbaum AD, Melkman-Zehavi T, Oren R, Kredo-Russo S, Nir T, Dor Y, Hornstein E** 2012 Dysregulation of Dicer1 in beta cells impairs islet architecture and glucose metabolism. *Exp Diabetes Res* 2012:470302
214. **Mark PJ, Smith JT, Waddell BJ** 2006 Placental and fetal growth retardation following partial progesterone withdrawal in rat pregnancy. *Placenta* 27:208-214
215. **Maslar IA, Ansbacher R** 1986 Effects of progesterone on decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium. *Endocrinology* 118:2102-2108
216. **Masumoto A, Masuyama H, Takamoto N, Akahori Y, Hiramatsu Y** 2010 Expression of antiangiogenic prolactin fragments in the placentas of women with pregnancy induced hypertension. *Acta Med Okayama* 64:249-255
217. **Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K** 1997 Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029-1033
218. **Maymo JL, Perez PA, Maskin B, Duenas JL, Calvo JC, Sanchez M, V, Varone CL** 2012 The alternative Epac/cAMP pathway and the MAPK pathway mediate hCG induction of leptin in placental cells. *PLoS One* 7:e46216
219. **McCance DR, Pettitt DJ, Hanson RL, Jacobsson LT, Knowler WC, Bennett PH** 1994 Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ* 308:942-945
220. **McEvoy RC, Andersson J, Sandler S, Hellerstrom C** 1984 Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in the mouse. Evidence for stimulation of a cytotoxic cellular immune response against an insulin-producing beta cell line. *J Clin Invest* 74:715-722
221. **McIntyre HD, Serek R, Crane DI, Veveris-Lowe T, Parry A, Johnson S, Leung KC, Ho KK, Bougoussa M, Hennen G, Igout A, Chan FY, Cowley D, Cotterill A, Barnard R** 2000 Placental growth hormone (GH), GH-binding protein, and insulin-like growth factor axis in normal, growth-retarded, and diabetic pregnancies: correlations with fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1143-1150
222. **Meager A** 1998 Interferons alpha, beta and omeg. *Cytokines*. ed.R Mire-Sluis and R Thorpe ed. Academic Press, San Diego, CA; 361-389
223. **Mesiano S, Wang Y, Norwitz ER** 2011 Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: do they hold the key to birth timing? *Reprod Sci* 18:6-19

224. **Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA** 2008 Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 358:1991-2002
225. **Mishima T, Miner JH, Morizane M, Stahl A, Sadovsky Y** 2011 The expression and function of fatty acid transport protein-2 and -4 in the murine placenta. *PLoS One* 6:e25865
226. **Misra M, Tsai PM, Mendes N, Miller KK, Klibanski A** 2009 Increased carbohydrate induced ghrelin secretion in obese vs. normal-weight adolescent girls. *Obesity (Silver Spring)* 17:1689-1695
227. **Mojani MS, Sarmadi VH, Vellasamy S, Sandrasaigaran P, Rahmat A, Peng LS, Ramasamy R** 2014 Evaluation of metabolic and immunological changes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Cell Immunol* 289:145-149
228. **Mondon F, Mignot TM, Rebourcet R, Jammes H, Danan JL, Ferre F, Vaiman D** 2005 Profiling of oxygen-modulated gene expression in early human placenta by systematic sequencing of suppressive subtractive hybridization products. *Physiol Genomics* 22:99-107
229. **Monk D, Sanches R, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, bu-Amero S, Murrell A, Friess H, Reik W, Stanier P, Constancia M, Moore GE** 2006 Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human. *Hum Mol Genet* 15:1259-1269
230. **Moser G, Gauster M, Orendi K, Glasner A, Theuerkauf R, Huppertz B** 2010 Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. *Hum Reprod* 25:1127-1136
231. **Nadra K, Anghel SI, Joye E, Tan NS, Basu-Modak S, Trono D, Wahli W, Desvergne B** 2006 Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *Mol Cell Biol* 26:3266-3281
232. **Ning Y, Williams MA, Muy-Rivera M, Leisenring WM, Luthy DA** 2004 Relationship of maternal plasma leptin and risk of pre-eclampsia: a prospective study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 15:186-192
233. **Novak D, Lehman M, Bernstein H, Beveridge M, Cramer S** 2006 SNAT expression in rat placenta. *Placenta* 27:510-516
234. **O'SULLIVAN JB, MAHAN CM** 1964 CRITERIA FOR THE ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST IN PREGNANCY. *Diabetes* 13:278-285
235. **Ogilvie S, Buhi WC, Olson JA, Shiverick KT** 1990 Identification of a novel family of growth hormone-related proteins secreted by rat placenta. *Endocrinology* 126:3271-3273

236. **Ogura K, Sakata M, Yamaguchi M, Kurachi H, Murata Y** 1999 High concentration of glucose decreases glucose transporter-1 expression in mouse placenta in vitro and in vivo. *J Endocrinol* 160:443-452
237. **Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA** 1997 Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev* 11:167-178
238. **Orwig KE, Dai G, Rasmussen CA, Soares MJ** 1997 Decidual/trophoblast prolactin-related protein: characterization of gene structure and cell-specific expression. *Endocrinology* 138:2491-2500
239. **Ozanne SE, Hales CN** 1998 Thrifty yes, genetic no. *Diabetologia* 41:485-487
240. **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
241. **Parra A, Ramirez-Peredo J** 2002 The possible role of prolactin in preeclampsia: 2001, a hypothesis revisited a quarter of century later. *Med Hypotheses* 59:378-384
242. **Perez-Perez A, Gambino Y, Maymo J, Goberna R, Fabiani F, Varone C, Sanchez-Margalet V** 2010 MAPK and PI3K activities are required for leptin stimulation of protein synthesis in human trophoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 396:956-960
243. **Pettitt DJ, Bennett PH, Saad MF, Charles MA, Nelson RG, Knowler WC** 1991 Abnormal glucose tolerance during pregnancy in Pima Indian women. Long-term effects on offspring. *Diabetes* 40 Suppl 2:126-130
244. **Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas MJ, Daniel JY, Leng JJ, Gin H** 2004 Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 37:293-298
245. **Philipps LH, Santhakumaran S, Gale C, Prior E, Logan KM, Hyde MJ, Modi N** 2011 The diabetic pregnancy and offspring BMI in childhood: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 54:1957-1966
246. **Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, Cameron IT, Ball SG, Wilson DI, Hanley NA** 2004 Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol* 181:11-23
247. **Pirkola J, Pouta A, Bloigu A, Hartikainen AL, Laitinen J, Jarvelin MR, Vaarasmaki M** 2010 Risks of overweight and abdominal obesity at age 16 years associated with prenatal exposures to maternal prepregnancy overweight and gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33:1115-1121
248. **Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V** 2004 Cathepsin D processes human prolactin into

multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol* 18:2522-2542

249. **Plagemann A** 2004 'Fetal programming' and 'functional teratogenesis': on epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. *J Perinat Med* 32:297-305
250. **Portha B, Giroix MH, Tourel-Cuzin C, Le-Stunff H, Movassat J** 2012 The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes. *Methods Mol Biol* 933:125-159
251. **Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G** 1974 Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 23:889-895
252. **POULSEN JE** 1953 Recovery from retinopathy in a case of diabetes with Simmonds' disease. *Diabetes* 2:7-12
253. **Prigent-Tessier A, Tessier C, Hirosawa-Takamori M, Boyer C, Ferguson-Gottschall S, Gibori G** 1999 Rat decidual prolactin. Identification, molecular cloning, and characterization. *J Biol Chem* 274:37982-37989
254. **Qiu C, Williams MA, Vadachkoria S, Frederick IO, Luthy DA** 2004 Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 103:519-525
255. **Radaelli T, Lepercq J, Varastehpour A, Basu S, Catalano PM, Hauguel-De MS** 2009 Differential regulation of genes for fetoplacental lipid pathways in pregnancy with gestational and type 1 diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 201:209
256. **Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Hauguel-De MS** 2003 Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* 52:2951-2958
257. **Rainey WE, Rehman KS, Carr BR** 2004 Fetal and maternal adrenals in human pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 31:817-35, x
258. **Rasmussen CA, Orwig KE, Vellucci S, Soares MJ** 1997 Dual expression of prolactin-related protein in decidua and trophoblast tissues during pregnancy in rats. *Biol Reprod* 56:647-654
259. **Rathmann W, Scheidt-Nave C, Roden M, Herder C** 2013 Type 2 diabetes: prevalence and relevance of genetic and acquired factors for its prediction. *Dtsch Arztebl Int* 110:331-337
260. **Ravelli AC, Van Der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP** 1998 Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351:173-177
261. **Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW** 1976 Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 295:349-353

262. **Remes LF, Rodriguez RC, Sabatte J, Cabrini M, Jancic C, Ostrowski M, Merlotti A, Gonzalez H, Alonso A, Pasqualini RA, Davio C, Geffner J, Ceballos A** 2012 Semen promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 189:4777-4786
263. **Reynolds WA, Chez RA, Bhuyan BK, Neil GL** 1974 Placental transfer of streptozotocin in the rhesus monkey. *Diabetes* 23:777-782
264. **Robertson SA** 2005 Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 322:43-52
265. **Robinson J, Canavan JP, el Haj AJ, Goldspink DF** 1988 Maternal diabetes in rats. I. Effects on placental growth and protein turnover. *Diabetes* 37:1665-1670
266. **Roby KF, Deb S, Gibori G, Szpirer C, Levan G, Kwok SC, Soares MJ** 1993 Decidual prolactin-related protein. Identification, molecular cloning, and characterization. *J Biol Chem* 268:3136-3142
267. **Rodriguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW** 1997 Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 137:93-104
268. **Rosenberg M, Mazella J, Tseng L** 1991 Relative potency of relaxin, insulin-like growth factors, and insulin on the prolactin production in progesterin-primed human endometrial stromal cells in long-term culture. *Ann N Y Acad Sci* 622:138-144
269. **Rosenfeld RG** 1997 An endocrinologist's approach to the growth hormone--insulin-like growth factor axis. *Acta Paediatr Suppl* 423:17-19
270. **Rossant J, Cross JC** 2001 Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2:538-548
271. **Saglam S, Wilson CB, Seymour RJ** 1970 Indications for hypophysectomy in diabetic retinopathy and cancer of the breast and prostate. *Calif Med* 113:1-6
272. **Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G** 2003 Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases--a review. *Placenta* 24 Suppl A:S76-S85
273. **Salomon DS, Sherman MI** 1975 The biosynthesis of progesterone by cultured mouse midgestation trophoblast cells. *Dev Biol* 47:394-406
274. **Sapin V, Dolle P, Hindelang C, Kastner P, Chambon P** 1997 Defects of the chorioallantoic placenta in mouse RXR α null fetuses. *Dev Biol* 191:29-41
275. **Satoh MS, Lindahl T** 1992 Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356:356-358

276. **Saunders DN, Hird SL, Withington SL, Dunwoodie SL, Henderson MJ, Biben C, Sutherland RL, Ormandy CJ, Watts CK** 2004 Edd, the murine hyperplastic disc gene, is essential for yolk sac vascularization and chorioallantoic fusion. *Mol Cell Biol* 24:7225-7234
277. **Schaefer-Graf UM, Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL** 2002 Clinical predictors for a high risk for the development of diabetes mellitus in the early puerperium in women with recent gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 186:751-756
278. **Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y** 2006 The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 249:10-15
279. **Schaiff WT, Carlson MG, Smith SD, Levy R, Nelson DM, Sadovsky Y** 2000 Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3874-3881
280. **Schaiff WT, Knapp FF, Jr., Barak Y, Biron-Shental T, Nelson DM, Sadovsky Y** 2007 Ligand-activated peroxisome proliferator activated receptor gamma alters placental morphology and placental fatty acid uptake in mice. *Endocrinology* 148:3625-3634
281. **Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB** 1994 STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43:1326-1333
282. **Selye H, Collip JB, Thomson DL** 1933 Effect of hypophysectomy upon pregnancy and lactation in mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 31:82-83
283. **Shalom-Barak T, Zhang X, Chu T, Timothy SW, Reddy JK, Xu J, Sadovsky Y, Barak Y** 2012 Placental PPARgamma regulates spatiotemporally diverse genes and a unique metabolic network. *Dev Biol* 372:143-155
284. **Shen F, Wei J, Snowise S, DeSousa J, Stone P, Viall C, Chen Q, Chamley L** 2014 Trophoblast debris extruded from preeclamptic placentae activates endothelial cells: A mechanism by which the placenta communicates with the maternal endothelium. *Placenta*
285. **Shi LY, Zhang ZW, Li WX** 1994 Regulation of human chorionic gonadotropin secretion and messenger ribonucleic acid levels by follistatin in the NUCC-3 choriocarcinoma cell line. *Endocrinology* 134:2431-2437
286. **Silverman BL, Rizzo T, Green OC, Cho NH, Winter RJ, Ogata ES, Richards GE, Metzger BE** 1991 Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes* 40 Suppl 2:121-125
287. **Singh BS, Westfall TC, Devaskar SU** 1997 Maternal diabetes-induced hyperglycemia and acute intracerebral hyperinsulinism suppress fetal brain neuropeptide Y concentrations. *Endocrinology* 138:963-969

288. **Sinha YN** 1995 Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 16:354-369
289. **Sisino G, Bouckenooghe T, Aurientis S, Fontaine P, Storme L, Vambergue A** 2013 Diabetes during pregnancy influences Hofbauer cells, a subtype of placental macrophages, to acquire a pro-inflammatory phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1832:1959-1968
290. **Sivan E, Reece EA, Wu YK, Homko CJ, Polansky M, Borenstein M** 1996 Dietary vitamin E prophylaxis and diabetic embryopathy: morphologic and biochemical analysis. *Am J Obstet Gynecol* 175:793-799
291. **Sjaarda LA, Albert PS, Mumford SL, Hinkle SN, Mendola P, Laughon SK** 2014 Customized large-for-gestational-age birthweight at term and the association with adverse perinatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 210:63
292. **Smerieri A, Petraroli M, Ziveri MA, Volta C, Bernasconi S, Street ME** 2011 Effects of cord serum insulin, IGF-II, IGFBP-2, IL-6 and cortisol concentrations on human birth weight and length: pilot study. *PLoS One* 6:e29562
293. **Smith JT, Waddell BJ** 2002 Leptin receptor expression in the rat placenta: changes in ob-ra, ob-rb, and ob-re with gestational age and suppression by glucocorticoids. *Biol Reprod* 67:1204-1210
294. **Soares MJ** 2004 The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol* 2:51
295. **Soares MJ, Glasser SR** 1987 Placental lactogen production and functional differentiation of rat trophoblast cells in vitro. *J Reprod Fertil* 79:335-341
296. **Soares MJ, Konno T, Alam SM** 2007 The prolactin family: effectors of pregnancy-dependent adaptations. *Trends Endocrinol Metab* 18:114-121
297. **Soares MJ, Muller H, Orwig KE, Peters TJ, Dai G** 1998 The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biol Reprod* 58:273-284
298. **Sobngwi E, Boudou P, Mauvais-Jarvis F, Leblanc H, Velho G, Vexiau P, Porcher R, Hadjadj S, Pratley R, Tataranni PA, Calvo F, Gautier JF** 2003 Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. *Lancet* 361:1861-1865
299. **Southard JN, Talamantes F** 1989 High molecular weight forms of placental lactogen: evidence for lactogen-macroglobulin complexes in rodents and humans. *Endocrinology* 125:791-800
300. **Stefanoska I, Jovanovic KM, Vasilijic S, Cujic D, Vicovac L** 2013 Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro. *Placenta* 34:775-783

301. **Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA** 1999 Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1246-1251
302. **Suwaki N, Masuyama H, Masumoto A, Takamoto N, Hiramatsu Y** 2007 Expression and potential role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the placenta of diabetic pregnancy. *Placenta* 28:315-323
303. **Symonds ME, Stephenson T, Gardner DS, Budge H** 2009 Tissue specific adaptations to nutrient supply: more than just epigenetics? *Adv Exp Med Biol* 646:113-118
304. **Takahashi H, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Ogata K, Takeuchi S** 1984 Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA complementary to human decidua prolactin mRNA. *J Biochem* 95:1491-1499
305. **Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, Taketani Y** 2006 Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology* 147:3203-3210
306. **Talamantes F, Ogren L, Markoff E, Woodard S, Madrid J** 1980 Phylogenetic distribution, regulation of secretion, and prolactin-like effects of placental lactogens. *Fed Proc* 39:2582-2587
307. **Tam WH, Ma RC, Yang X, Li AM, Ko GT, Kong AP, Lao TT, Chan MH, Lam CW, Chan JC** 2010 Glucose intolerance and cardiometabolic risk in adolescents exposed to maternal gestational diabetes: a 15-year follow-up study. *Diabetes Care* 33:1382-1384
308. **Tang Z, Abrahams VM, Mor G, Guller S** 2011 Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 1221:103-108
309. **Tennant PW, Glinianaia SV, Bilous RW, Rankin J, Bell R** 2014 Pre-existing diabetes, maternal glycated haemoglobin, and the risks of fetal and infant death: a population-based study. *Diabetologia* 57:285-294
310. **Thaler CD, Epel D** 2003 Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr Pharm Des* 9:399-409
311. **Thomsen BM, Clausen HV, Larsen LG, Nurnberg L, Ottesen B, Thomsen HK** 1997 Patterns in expression of insulin-like growth factor-II and of proliferative activity in the normal human first and third trimester placenta demonstrated by non-isotopic in situ hybridization and immunohistochemical staining for MIB-1. *Placenta* 18:145-154
312. **Thordarson G, Folger P, Talamantes F** 1987 Development of a placental cell culture system for studying the control of mouse placental lactogen II secretion. *Placenta* 8:573-585

313. **Toft JH, Lian IA, Tarca AL, Erez O, Espinoza J, Eide IP, Bjorge L, Draghici S, Romero R, Austgulen R** 2008 Whole-genome microarray and targeted analysis of angiogenesis-regulating gene expression (ENG, FLT1, VEGF, PlGF) in placentas from pre-eclamptic and small-for-gestational-age pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med* 21:267-273
314. **Tomoko KI, Fumitoshi I** 2012 The role of genes domesticated from LTR retrotransposons and retroviruses in mammals. *Front microbiol*
315. **Toth P, Li X, Rao CV, Lincoln SR, Sanfilippo JS, Spinnato JA, Yussman MA** 1994 Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J Clin Endocrinol Metab* 79:307-315
316. **Triebel J, Macotela Y, de la Escalera GM, Clapp C** 2011 Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *IUBMB Life* 63:806-810
317. **Tsatsaris V, Malassine A, Fournier T, Handschuh K, Schaaps JP, Foidart JM, Evain-Brion D** 2006 *Placenta humaine*. EMC
318. **Uddin MN, Beeram MR, Kuehl TJ** 2013 Diabetes Mellitus and Preeclampsia. *Med J Obstet Gynecol* 1:1016
319. **Uddin MN, Horvat D, Roth AL, Pringle KG, Allen SR, Jones RO, Zawieja DC, Kuehl TJ** 2013 Hyperglycemia induces an antiangiogenic milieu in first trimester cytotrophoblast cell. *The FASEB Journal* 27:835.5
320. **Underhill DM, Goodridge HS** 2012 Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* 12:492-502
321. **UVMaF** 2011, http://www.uvmf.org/UE-obstetrique/placenta/site/html/2_25_1.html
322. **Vaarasmaki M, Pouta A, Elliot P, Tapanainen P, Sovio U, Ruokonen A, Hartikainen AL, McCarthy M, Jarvelin MR** 2009 Adolescent manifestations of metabolic syndrome among children born to women with gestational diabetes in a general-population birth cohort. *Am J Epidemiol* 169:1209-1215
323. **Vambergue A, Dognin C, Boulogne A, Rejou MC, Biaisque S, Fontaine P** 2008 Increasing incidence of abnormal glucose tolerance in women with prior abnormal glucose tolerance during pregnancy: DIAGEST 2 study. *Diabet Med* 25:58-64
324. **Vambergue A, Nuttens MC, Verier-Mine O, Dognin C, Cappoen JP, Fontaine P** 2000 Is mild gestational hyperglycaemia associated with maternal and neonatal complications? The Diagest Study. *Diabet Med* 17:203-208
325. **Van Assche FA, Holemans K, Aerts L** 2001 Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br Med Bull* 60:173-182

326. **Vohr BR, McGarvey ST, Tucker R** 1999 Effects of maternal gestational diabetes on offspring adiposity at 4-7 years of age. *Diabetes Care* 22:1284-1291
327. **Volpert O, Luo W, Liu TJ, Estrera VT, Logothetis C, Lin SH** 2002 Inhibition of prostate tumor angiogenesis by the tumor suppressor CEACAM1. *J Biol Chem* 277:35696-35702
328. **Wahabi HA, Alzeidan RA, Esmaeil SA** 2012 Pre-pregnancy care for women with pre-gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 12:792
329. **Waite LL, Person EC, Zhou Y, Lim KH, Scanlan TS, Taylor RN** 2000 Placental peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is up-regulated by pregnancy serum. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3808-3814
330. **Walker WH, Fitzpatrick SL, Barrera-Saldana HA, Resendez-Perez D, Saunders GF** 1991 The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocr Rev* 12:316-328
331. **Walkinshaw S.A.** 2001 Type 1 diabetes and pregnancy. *Current Obstetrics and Gynecology* 11:321-328
332. **Wang D, Ishimura R, Walia DS, Muller H, Dai G, Hunt JS, Lee NA, Lee JJ, Soares MJ** 2000 Eosinophils are cellular targets of the novel uteroplacental heparin-binding cytokine decidual/trophoblast prolactin-related protein. *J Endocrinol* 167:15-28
333. **Wang Q, Fujii H, Knipp GT** 2002 Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas. *Placenta* 23:661-671
334. **Warner MJ, Ozanne SE** 2010 Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J* 427:333-347
335. **Warshaw ML, Johnson DC, Khan I, Eckstein B, Gibori G** 1986 Placental secretion of androgens in the rat. *Endocrinology* 119:2642-2648
336. **Waterman IJ, Emmison N, Dutta-Roy AK** 1998 Characterisation of triacylglycerol hydrolase activities in human placenta. *Biochim Biophys Acta* 1394:169-176
337. **Watson CS, Bialek P, Anzo M, Khosravi J, Yee SP, Han VK** 2006 Elevated circulating insulin-like growth factor binding protein-1 is sufficient to cause fetal growth restriction. *Endocrinology* 147:1175-1186
338. **Watson ED, Cross JC** 2005 Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)* 20:180-193
339. **Weiss PA, Scholz HS, Haas J, Tamussino KF, Seissler J, Borkenstein MH** 2000 Long-term follow-up of infants of mothers with type 1 diabetes: evidence for hereditary and nonhereditary transmission of diabetes and precursors. *Diabetes Care* 23:905-911

340. **Welsh AO, Enders AC** 1985 Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. *Am J Anat* 172:1-29
341. **Wen Y, Gu J, Li SL, Reddy MA, Natarajan R, Nadler JL** 2006 Elevated glucose and diabetes promote interleukin-12 cytokine gene expression in mouse macrophages. *Endocrinology* 147:2518-2525
342. **Wery E, Vambergue A, Le GF, Vincent D, Deruelle P** 2014 [Impact of the new screening criteria on the gestational diabetes prevalence]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 43:307-313
343. **White V, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Capobianco E, Gonzalez E** 2002 Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Reprod Fertil Dev* 14:117-123
344. **Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J** 2011 IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 94:311-321
345. **Wiemers DO, Shao LJ, Ain R, Dai G, Soares MJ** 2003 The mouse prolactin gene family locus. *Endocrinology* 144:313-325
346. **Williams KT, Garrow TA, Schalinske KL** 2008 Type I diabetes leads to tissue-specific DNA hypomethylation in male rats. *J Nutr* 138:2064-2069
347. **Wilson GL, Hartig PC, Patton NJ, LeDoux SP** 1988 Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes* 37:213-216
348. **Winterbourn CC, Cowden WB, Sutton HC** 1989 Auto-oxidation of dialuric acid, divicine and isouramil. Superoxide dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol* 38:611-618
349. **Wu WX, Brooks J, Glasier AF, McNeilly AS** 1995 The relationship between decidualization and prolactin mRNA and production at different stages of human pregnancy. *J Mol Endocrinol* 14:255-261
350. **Xu Y, Wang Q, Cook TJ, Knipp GT** 2007 Effect of placental fatty acid metabolism and regulation by peroxisome proliferator activated receptor on pregnancy and fetal outcomes. *J Pharm Sci* 96:2582-2606
351. **Yamada K, Nonaka K, Hanafusa T, Miyazaki A, Toyoshima H, Tarui S** 1982 Preventive and therapeutic effects of large-dose nicotinamide injections on diabetes associated with insulinitis. An observation in nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 31:749-753
352. **Yamaguchi M, Kawai M, Kishi K, Miyake A** 1995 Regulation of rat placental lactogen (rPL)-II secretion: cAMP inhibits rPL-II secretion in vitro. *Eur J Endocrinol* 133:342-346

353. **Yang Y, Yelavarthi KK, Chen HL, Pace JL, Terranova PF, Hunt JS** 1993 Molecular, biochemical, and functional characteristics of tumor necrosis factor- α produced by human placental cytotrophoblastic cells. *J Immunol* 150:5614-5624
354. **Yang ZZ, Tschopp O, Hemmings-Mieszczak M, Feng J, Brodbeck D, Perentes E, Hemmings BA** 2003 Protein kinase B α /Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem* 278:32124-32131
355. **Yonemura Y, Takashima T, Miwa K, Miyazaki I, Yamamoto H, Okamoto H** 1984 Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors. Evidence of islet B-cell regeneration. *Diabetes* 33:401-404
356. **Yonezawa S, Takahashi T, Wang XJ, Wong RN, Hartsuck JA, Tang J** 1988 Structures at the proteolytic processing region of cathepsin D. *J Biol Chem* 263:16504-16511
357. **Zhou B, Kong X, Linzer DI** 2005 Enhanced recovery from thrombocytopenia and neutropenia in mice constitutively expressing a placental hematopoietic cytokine. *Endocrinology* 146:64-70
358. **Zhou B, Lum HE, Lin J, Linzer DI** 2002 Two placental hormones are agonists in stimulating megakaryocyte growth and differentiation. *Endocrinology* 143:4281-4286
359. **Zhou Y, Bellingard V, Feng KT, McMaster M, Fisher SJ** 2003 Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C. *Dev Biol* 263:114-125
360. **Ziche M, Morbidelli L** 2000 Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 50:139-148