



HAL
open science

Cinétique d'expression hypothalamique des microARN chez le rat : impact d'un régime maternel hyperlipidique

Soraya Doubi Kadmiri Doubi Kadmiri

► To cite this version:

Soraya Doubi Kadmiri Doubi Kadmiri. Cinétique d'expression hypothalamique des microARN chez le rat : impact d'un régime maternel hyperlipidique. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS019 . tel-01303745

HAL Id: tel-01303745

<https://theses.hal.science/tel-01303745>

Submitted on 18 Apr 2016

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.

NNT : 2015SACLS019

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N°568
BIOSIGNE - Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie

Spécialité Sciences de la vie et de la santé

Par

Soraya DOUBI-KADMIRI

CINETIQUE D'EXPRESSION HYPOTHALAMIQUE
DES MICROARN CHEZ LE RAT :
IMPACT D'UN REGIME MATERNEL HYPERLIPIDIQUE

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 28 janvier 2016

Composition du Jury :

Pr. Anne Guiochon-Mantel
Dr. Alexandra Henrion-Caude
Dr. Jacques Epelbaum
Dr. Luc Pénicaud
Dr. Laurence Amar

Président
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury. Je remercie le Pr Anne Guiochon-Mantel d'avoir accepté de présider mon jury de Thèse, le Dr Alexandra Henrion-Caude et le Dr Nicolas Chartrel d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma Thèse. Je remercie également le Dr Jacques Epelbaum et le Dr Luc Penicaud d'avoir accepté d'être examinateurs de mes travaux. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Je remercie sincèrement ma directrice de Thèse, le Dr Laurence Amar, de m'avoir permis de faire une grande partie de mon cursus universitaire au sein du laboratoire. Merci de m'avoir accompagnée durant ces cinq années d'apprentissage et de construction scientifique. Tu m'as appris à développer un esprit critique et à analyser les résultats avec beaucoup de curiosité. Merci de m'avoir ouvert la porte de ton cocon familial pour de longues journées de corrections. Tu remercieras également Olivier pour les bulles.

Je remercie particulièrement le Pr Mohammed Taouis, le Dr Claire-Marie Vacher et le Dr Yacir Benomar de m'avoir donné goût à l'endocrinologie. C'est grâce à vos cours passionnants que j'ai eu envie de faire mon stage de Master 1 dans votre laboratoire. Merci de m'avoir ouvert les portes de la Thèse au sein de NMPA.

Je remercie le Dr Anne Baroin pour sa gentillesse et sa douceur qui ont accompagné ma thèse. Merci pour tes encouragements et tes compliments, ça donne du baume au cœur.

Je remercie Xavier Begnini pour son aide précieuse en bio-informatique. Sans toi je n'aurais pu sortir mes profils d'expression.

Je remercie Charlotte Benoit de m'avoir initié à l'animalerie et à la physiologie, initiation qui fut de courte durée. Eh oui, une petite maman a décidé de goûter à ma chair. Merci pour tes conseils que j'ai eu la chance d'avoir bien après ton départ du labo.

Je remercie Delphine Crépin, Laure Riffault, Ghislaine Poizat et Alain Aubourg pour nos petites discussions de couloirs entre deux manips.

Je remercie Hassina Oul Hammouda, Hamza Amine et Sarah El Rifai pour tous les bons moments que l'on a passés dans ce fameux bureau, qui soit dit en passant n'hébergeait pas que des étudiants mais pas mal de petites bestioles. J'en profite pour remercier Hamza d'avoir tué toutes les punaises qui trouvaient refuge dans le labo, j'aurais eu du mal à finir mes manips sans ça. J'ai beaucoup apprécié nos grands moments papotages ainsi que nos pauses musicales qui égayaient nos journées.

Je remercie mes parents d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenue. Ils n'ont eu de cesse de m'encourager tout au long de cette aventure et dans tout ce que j'ai pu entreprendre au cours de ma vie. Un énorme merci pour tout l'amour que vous me donnez.

Je remercie mon frère et ma sœur de m'avoir hébergés ces derniers mois et de m'avoir longuement écoutés monologuer sur ma thèse. Merci tout simplement d'être vous et d'être là.

Je remercie mes beaux-parents pour leur soutien et leurs encouragements. Merci pour votre présence.

Je remercie mes amis et ma famille pour tous les agréables moments partagés, leurs conseils et leur soutien.

Je remercie infiniment Jalil, d'avoir été un mari exemplaire, particulièrement ces derniers mois qui n'ont pas été des plus faciles. Tout mon stress s'est déversé sur toi et je m'en excuse. Merci d'avoir été une épaule aussi confortable, merci de m'avoir longuement écouté parler de ma Thèse, toujours conseillé au mieux et remonter le moral à chaque moment de doute. Tu as été d'un indispensable soutien. Une page se tourne et je suis heureuse à l'idée de pouvoir en écrire de nouvelles à tes côtés.

LISTE DES ABREVIATIONS

3'-OH : extrémité 3' hydroxyl
5'-Pi : extrémité 5' phosphate inorganique
 α -MSH : α -Melanocyte-stimulating hormone
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AGO2 : argonaute 2
AgRP : agouti-related peptide
AHL : aire hypothalamique latérale
APO : aire pré-optique
AQP4 : aquaporine 4
ARC : noyau arqué
ARN : acide ribonucléique
ARNi : ARN interférence
ARNm : ARN messenger
ARNnc : ARN non codant
ATV : aire tegmentale ventrale
AVP : vasopressine
BDNF : brain-derived neurotrophic factor
BHE : barrière hémato-encéphalique
C : contrôle
CART : cocaine-and-amphetamine-regulated transcript
CCK : cholecystokinine
CD38 : cluster de différenciation 38
CRH : Corticotropin-releasing hormone
CRH-R : récepteur à la CRH
CV : coefficient de variation
Da : dalton
Db : double brin
DiI : 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DGCR8 : DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DIO : diet induced obesity
DOHaD : Developmental Origins of Health and Disease
Dy : Dynorphine
EM : éminence médiane
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FSH : hormone folliculo-stimulante
GABA : acide γ -aminobutyrique
GDP : guanosine diphosphate
GH : Growth Hormone
GHRH : Growth Hormone Releasing Hormone
GnRH : Gonadotropin-releasing hormone
GPR54 : G-Protein Coupled Receptor 54
GTP : guanosine triphosphate
HF : high fat ou hyperlipidique
HL : hyperlipidique
HMB : hypothalamus ventro-médian
ICV : intracérébroventriculaire
IGF2 : insulin-like growth factor 2
IL : interleukine
IP : intrapéritonéale
IR : récepteur à l'insuline
KISS1 : kisspeptine
KNDy : kisspeptine/neurokinineB/dynorphine
KO : knock-out
LCR : liquide céphalo-rachidien
LH : hormone lutéinisante
MC3/4R : récepteur mélanocortine 3/4
MCH : Melanin Concentrating Hormone
MCH-R : récepteur à MCH
miARN : microARN
miR : gène de miARN
NDM : noyau dorsomédian
NKB : neurokinine B
NK3R : récepteur à la neurokinine
NPV : noyau paraventriculaire
NPY : neuropeptide Y
NTS : noyau du tractus solitaire
Nts : neurotensine
NVM : noyau ventro-médian
ObR : récepteur de la leptine
OCV : organes circumventriculaires
ORX : orexines

OXT : ocytocine
OXR : récepteur à l'ORX
OXTR : récepteur à l'OXT
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
POMC : pro-opiomélanocortine
PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptors α
RISC : RNA-induced silencing complex
RT : rétro-transcription
RT-qPCR : rétro-transcription et réaction de polymérisation en chaîne quantitative
SF-1 : steroidogenic factor 1
SM : système mélanocortine
SNC : système nerveux central
SRIF : somatotropin release-inhibiting factor
stARN : small temporal ARN
TEF : Thyrotroph embryonic factor
TK : tyrosine kinase
TLDA : TaqMan Low Density Array
TNF α : tumor necrosis factor alpha
TRBP : transactivation response RNA binding protein
TRH : thyrotropin-releasing hormone
TRH-R : récepteur à la TRH
TrkB : récepteur au BDNF
TSH : Thyroïd Stimulating Hormone
UTR : untranslated region
V1a, V1b et V2 : récepteurs à l'AVP
VEGFA : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A
WT : wild type
YAP : Yes-associated protein
Y1-6 : récepteur à NPY 1 à 6

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	2
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLES	8
RESUME	9
PREAMBULE	11
INTRODUCTION	13
CHAPITRE I : HYPOTHALAMUS ET HOMEOSTASIE ENERGETIQUE.....	14
1.1. NOYAUX HYPOTHALAMIQUES DE L'HOMEOSTASIE ENERGETIQUE.....	14
1.1.1. <i>Noyau arqué (ARC)</i>	16
1.1.1.1. Neurones POMC/CART.....	17
1.1.1.2. Neurones NPY/AgRP.....	17
1.1.1.3. Neurones KNDy.....	18
1.1.1.4. Afférences et efférences de l'ARC.....	20
1.1.2. <i>Noyau paraventriculaire (NPV)</i>	21
1.1.2.1. Neurones TRH.....	22
1.1.2.2. Neurones CRH.....	22
1.1.2.3. Neurones ocytocine (OXT).....	23
1.1.2.4. Neurones vasopressine (AVP).....	23
1.1.2.5. Afférences et efférences du NPV.....	24
1.1.3. <i>Aire hypothalamique latérale (AHL)</i>	24
1.1.3.1. Neurones ORX.....	25
1.1.3.2. Neurones MCH.....	25
1.1.3.3. Afférences et efférences de l'AHL.....	26
1.1.4. <i>Noyau ventro-médian (NVM)</i>	26
1.1.4.1. Neurones SF-1.....	27
1.1.4.2. Neurones BDNF.....	27
1.1.4.3. Afférences et efférences du NVM.....	27
1.1.5. <i>Noyau dorso-médian (NDM)</i>	28
1.1.5.1. Neurones NPY.....	28
1.1.5.2. Afférences et efférences du NDM.....	29
1.1.6. <i>Eminence médiane (EM)</i>	29
1.2. HYPOTHALAMUS ET INTEGRATION DES SIGNAUX PERIPHERIQUES.....	29
1.2.1. <i>Intégration via la BHE</i>	29
1.2.2. <i>Intégration via le LCR et les tanocytes</i>	30
1.2.3. <i>Statut énergétique de l'organisme et intégration des signaux périphériques</i>	31
1.3. ONTOGENESE HYPOTHALAMIQUE.....	32
1.3.1. <i>Expression des neuropeptides hypothalamiques</i>	32
1.3.2. <i>Neuritogenèse hypothalamique</i>	33
1.3.3. <i>Rôle neurotrophique de la leptine</i>	33
1.4. LEPTINE.....	34
1.4.1. <i>Récepteurs et transport de la leptine</i>	34
1.4.2. <i>Expression du récepteur <i>Obrb</i></i>	35
1.4.3. <i>Leptino-resistance</i>	35
1.5. INSULINE.....	36
1.5.1. <i>Récepteurs et transport de l'insuline</i>	36
1.5.2. <i>Expression du récepteur <i>IR</i></i>	37
1.5.3. <i>Insulino-resistance</i>	37

CHAPITRE II : PROGRAMMATION METABOLIQUE	38
2.1. PROGRAMMATION METABOLIQUE PAR DES REGIMES HYPERLIPIDIQUES.....	38
2.1.1. Régimes hyperlipidiques pré-gestationnels.....	39
2.1.1.1. Programmation métabolique sous régime hyperlipidique au sevrage.....	44
2.1.1.2. Programmation métabolique sous régime hyperlipidique à long terme.....	46
2.1.2. Régimes hyperlipidiques gestationnels.....	48
2.1.2.1. Programmation métabolique sous régime HF.....	51
2.1.3. Régimes hyperlipidiques restreints à la gestation.....	52
2.1.4. Régimes hyperlipidiques restreints à la lactation.....	54
2.2. REGIMES MATERNELS HYPERLIPIDIQUES ET DEVELOPPEMENT HYPOTHALAMIQUE	56
2.3. REGIMES MATERNELS HYPERLIPIDIQUES ET INFLAMMATION.....	57
2.4. REGIMES MATERNELS HYPERLIPIDIQUES ET MODIFICATIONS EPIGENETIQUES.....	59
2.4.1. Effet d'une surnutrition induite par la taille de la portée	59
CHAPITRE III : MICROARN	61
3.1. DECOUVERTE DES MICROARN.....	61
3.1.1. <i>microARN au cours de l'évolution</i>	62
3.1.2. <i>Biosynthèse des microARN</i>	63
3.1.2.1. Maturation des miARN intergéniques	63
3.1.2.2. Maturation des miARN introniques.....	66
3.1.2.3. IsomiRs.....	67
3.1.3. <i>Mécanismes d'action des microARN chez les mammifères</i>	68
3.1.3.1. Sites d'interaction du miARN.....	68
3.1.3.2. Sites d'interaction de l'ARNm cible.....	70
3.1.3.3. Prédiction des cibles des microARN.....	71
3.1.4. <i>microARN au cours du développement</i>	72
OBJECTIFS	74
RESULTATS EXPERIMENTAUX	75
<i>Etude I</i>	76
<i>Etude II</i>	93
<i>Etude III</i>	129
<i>Etude IV</i>	150
DISCUSSION ET CONCLUSION	168
<i>Discussion</i>	169
<i>Conclusion</i>	180
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	181

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Homéostasie énergétique</i> -----	11
<i>Figure 2 : Voies neuronales impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique et des systèmes de récompense, décision et apprentissage.</i> -----	14
<i>Figure 3 : Système hypothalamo-hypophysaire</i> -----	11
<i>Figure 4 : Noyaux et aires hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie énergétique</i> -----	15
<i>Figure 5 : Métabolisme et fonction de reproduction</i> -----	16
<i>Figure 6 : Afférences des neurones POMC et AgRP de l'ARC.</i> -----	20
<i>Figure 7 : Efférences des neurones POMC/CART et NPY/AgRP de l'ARC au sein de l'hypothalamus</i> --	21
<i>Figure 8 : Organisation des tanocytes au sein de l'hypothalamus médio-basal</i> -----	30
<i>Figure 9 : Pic post-natal de leptine chez la souris</i> -----	33
<i>Figure 10 : Les différents isoformes du récepteur à la leptine</i> -----	34
<i>Figure 11 : Régime hyperlipidique pré-gestationnel - Schéma expérimental</i> -----	36
<i>Figure 12 : impact d'un régime maternel HF sur les projections axonales de la descendance</i> -----	54
<i>Figure 13 : Inflammation centrale induite par un régime maternel HF</i> -----	58
<i>Figure 14 : Effets épigénétiques d'une exposition à un régime maternel hyperlipidique</i> -----	60
<i>Figure 15 : Structure du pri-miARN</i> -----	63
<i>Figure 16 : Maturation du pri-miARN en pré-miARN</i> -----	64
<i>Figure 17 : Voie de biosynthèse des microARN</i> -----	65
<i>Figure 18 : Biosynthèse des mirtrons</i> -----	66
<i>Figure 19 : miARN et isomiRs</i> -----	67
<i>Figure 20 : Différents appariements des régions « seed » et 3'-UTR</i> -----	69
<i>Figure 21 : Appariements des régions « seed » et 3' du miARN</i> -----	69
<i>Figure 22 : Identification des ARN interagissant avec les miARN</i> -----	70

LISTE DES TABLES

<i>Table 1: impact de régimes maternels hyperlipidiques pré-gestationnels sur la réponse adaptative immédiate de la descendance</i>	41
<i>Table 2: impact de régimes maternels hyperlipidique pré-gestationnels sur la réponse adaptative prédictive de la descendance</i>	42
<i>Table 3 : impact d'un régime maternel HF pré-gestationnel sur le métabolisme de la descendance sevrée au régime hyperlipidique</i>	45
<i>Table 4 : impact de régimes maternels hyperlipidiques pré-gestationnels sur le métabolisme de la descendance adulte</i>	47
<i>Table 5 : impact de régimes maternels hyperlipidiques gestationnels sur la réponse adaptative immédiate de la descendance</i>	49
<i>Table 6 : impact de régimes maternels hyperlipidiques gestationnels sur la réponse adaptative prédictive de la descendance</i>	50
<i>Table 7 : impact de régimes maternels hyperlipidiques gestationnels sur le métabolisme de la descendance adulte sous régime hyperlipidique</i>	51
<i>Table 8: impact de régimes maternels hyperlipidiques restreints à la gestation sur les réponses adaptatives immédiate et prédictive de la descendance</i>	53
<i>Table 9 : impact de régimes maternels hyperlipidiques restreints à la lactation sur les réponses adaptative immédiate et prédictive de la descendance</i>	55
<i>Table 10 : MicroARN dont l'expression est spécifiquement programmée par l'environnement hyperlipidique périnatal HF1 dans l'ARC de la descendance âgée de 7 mois</i>	174
<i>Table 11 : MicroARN dont l'expression est conditionnée par l'environnement hyperlipidique HF1 de 10 semaines dans l'ARC de la descendance âgée de 7 mois</i>	174
<i>Table 12 : MicroARN dont l'expression est programmée par l'environnement hyperlipidique périnatal HF1 dans l'ARC de la descendance HF1 âgée de 7 mois</i>	175
<i>Table 13 : MicroARN dont l'expression est conditionnée par l'environnement hyperlipidique de 10 semaines dans l'ARC de la descendance HF1 âgée de 7 mois</i>	176

RESUME

Le concept de programmation métabolique repose sur les études épidémiologiques menées par David Barker à la fin des années 1980 qui ont montré qu'une sous-nutrition maternelle durant la grossesse contribue à un faible poids de naissance et à une pathologie cardiovasculaire à l'âge adulte. Le concept actuel de « Developmental Origins of Health and Disease » (DOHaD) postule que l'environnement périnatal (grossesse et allaitement) conditionne la physiologie de la descendance à long terme. Au delà d'une sous-nutrition périnatale, de nombreuses études expérimentales menées chez l'animal ont montré qu'un régime maternel hyperlipidique (HF) programmait des modifications des homéostasies énergétique, glucidique et lipidique chez les descendants adultes.

Chez les mammifères, l'expression du génome est modulée par de petits ARN d'une vingtaine de nucléotides, les microARN (miARN), inhibiteurs de la traduction des ARNm en protéines ou initiateurs de leur dégradation. Le noyau arqué hypothalamique (ARC) est un régulateur important de l'homéostasie énergétique. Les miARN participent-ils à la régulation de l'expression génique dans l'ARC ? Un régime hyperlipidique modifie-t-il leur expression ? L'environnement périnatal altère-t-il certaines régulations moléculaires dans l'ARC ?

Mon travail de thèse a consisté d'une part à caractériser physiologiquement un modèle de programmation métabolique par un régime maternel HF chez le rat, et d'autre part à étudier l'expression des miARN dans l'ARC des deux descendances C et HF aux stades de développement P4 à P216. Pour cela, des mères ont été nourries avec un régime équilibré (régime C) ou différents régimes HF (nommés HF1 et HF2) avant la gestation et/ou durant les périodes de gestation et lactation. Les deux régimes HF1 et HF2 présentent le même apport calorique en provenance des lipides (46%) et diffèrent par leurs apports caloriques en provenance des protéines (16% et 27% respectivement) et des carbohydrates (39% et 26% respectivement). Les animaux ont été sevrés sous régime C. Le régime maternel HF1 induit une différence de croissance corporelle et de leptinémie durant la période de lactation alors que le régime maternel HF2 n'induit pas de différence de croissance chez la descendance. A P216, le régime maternel HF1 altère le métabolisme glucidique de la descendance, en induisant une hyperinsulinémie et une hyperglycémie, signe d'une insulino-résistance. Le régime maternel HF2 ne montre aucun impact sur le métabolisme glucidique de la descendance adulte.

Nous avons étudié les profils d'expression des miARN des descendance C et HF1 à cinq stades postnataux, P4, P8, P14, P21 et P28 afin d'identifier l'impact direct du régime maternel. Nous avons également établi les profils d'expression aux stades juvénile, P75 et adulte, P216 afin d'étudier l'impact indirect. Par ailleurs, une partie des animaux ont été transférés sous régime HF1 entre 4,5 et 7 mois. Nous avons étudié les profils d'expression de miARN de ces animaux afin de déterminer l'éventuel effet synergique de régimes HF1 périnatal et adulte.

Pour ce faire nous avons étudié les profils d'expression de plus de 500 miARN pour chaque ARC par la technologie de séquençage haut-débit Illumina et/ou RT-qPCR. Nous avons observé que les profils d'expression de miARN des stades développementaux P4 à P28 des descendance C présentaient 6% à 44% de différence d'expression. Nous avons également étudié les profils d'expression des descendance HF et observé la même cinétique d'expression. Ces résultats démontrent la plasticité d'expression des miARN au cours des trois premières semaines post-natales. A chaque stade, le régime HF1 n'induit que 1% à 7% de différence d'expression avec les profils d'expression de miARN des descendance C. Ces résultats démontrent une robustesse des profils d'expressions de miARN à ces stades de développement précoce. Aucune différence n'est observée durant la période juvénile. Cependant à l'âge adulte, 20% à 30% des miARN ont une expression différentielle chez les descendance HF1.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'expression des miARN chez l'adulte reflète le contexte lipidique périnatal. Nous avons par ailleurs observé une corrélation positive de l'impact des environnements périnatal et adulte sur les profils d'expression de miARN chez la descendance C, l'expression de 22 miARN est modifiée à la fois par l'environnement périnatal et adulte. Nous avons également observé une anti-corrélation de l'impact de ces deux environnements chez la descendance HF, l'expression de 48 miARN est modifiée à la fois par l'environnement périnatal et adulte. Autrement dit, la concordance des deux environnements rétabli une expression « normale ». Nous avons donc démontré que l'expression des miARN de l'ARC, tout comme la glycémie sont soumis à une programmation par le régime alimentaire maternel.

PREAMBULE

Le terme d'homéostasie, forgé à la fin du XIX^e siècle par Claude Bernard, désigne « la capacité d'un système à conserver un équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes extérieures ». Le concept d'homéostasie énergétique rend compte d'un équilibre entre les apports alimentaires et les dépenses énergétiques (métabolisme, dépenses physiques et thermogénèse) qui permet à l'adulte de maintenir un poids stable. Le maintien de cet équilibre implique de nombreux tissus (figure 1).

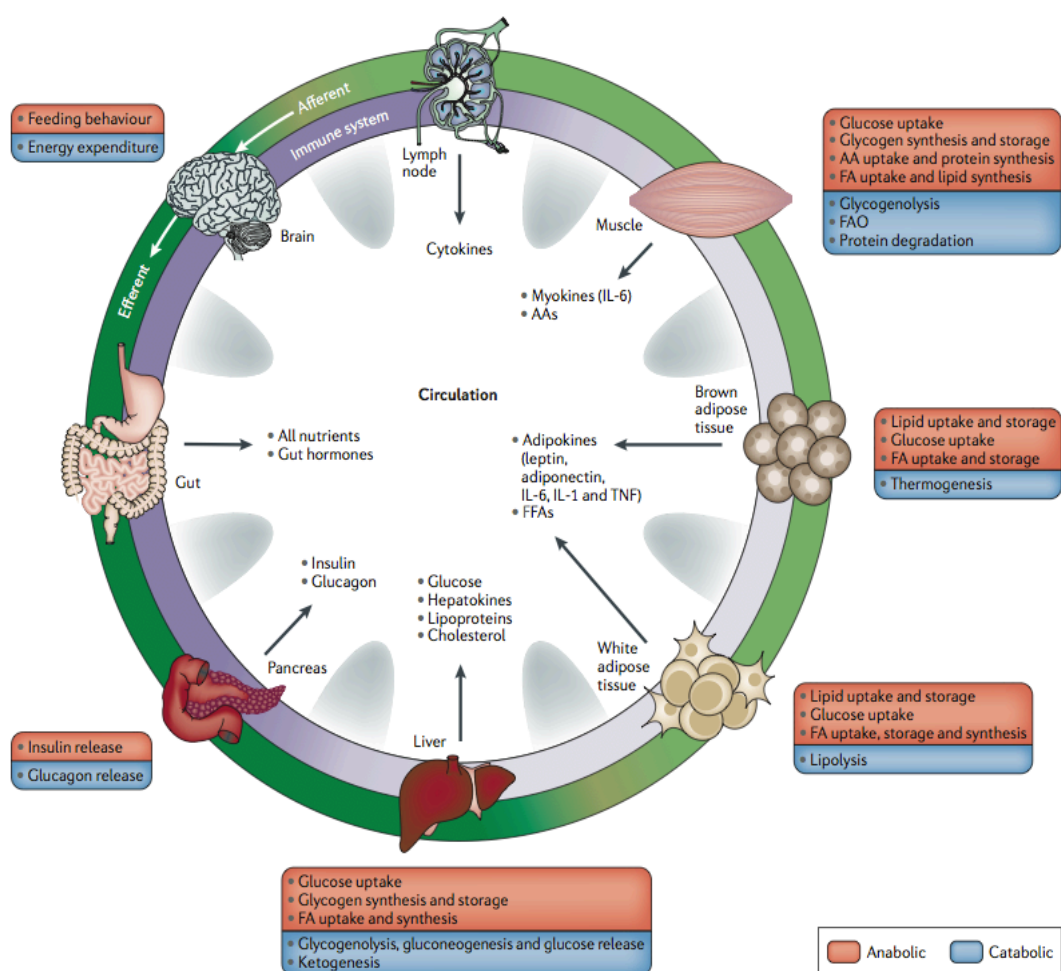


Figure 1 : Homéostasie énergétique

Chez les métazoaires, la régulation de l'homéostasie énergétique implique des tissus spécialisés capables d'intégrer des informations nutritives, endocrines et nerveuses. Au niveau cellulaire, ces informations conduisent à des processus *anaboliques* et *cataboliques*. AAs : acides aminés, FA : acides gras, FAO : acides gras oxydés, FFAs : acides gras libres, IL : interleukines, TNF : tumour necrosis factor. Tirée de la revue : Lempradl et al., 2015.

Au niveau du système nerveux central (SNC), le maintien de l'homéostasie énergétique implique plus particulièrement l'hypothalamus et le noyau du tractus solitaire (NTS). Le NTS est localisé au niveau du tronc cérébral et l'hypothalamus (cf. chapitre I) forme le plancher et les parois du troisième ventricule. Ces deux structures reçoivent des informations nerveuses, hormonales et métaboliques. Ils intègrent les informations hormonales telles que la leptine, l'insuline, la ghréline et nerveuses *via* le système nerveux autonome qu'ils relayent à d'autres structures nerveuses. Le NTS reçoit les informations par l'intermédiaire du nerf vague. Les terminaisons nerveuses de ce dernier sont notamment activées par la distension de l'estomac et du tractus digestif lors du passage du bol alimentaire ainsi que par les hormones gastro-intestinales tels que la cholecystokinine, le peptide YY ou la ghréline et les nutriments libérés par le tractus digestif.

Ma thèse porte sur l'étude de la programmation d'expression des microARN (miARN) par un régime maternel hyperlipidique dans le noyau arqué hypothalamique (ARC) du rat.

Le premier chapitre de mon introduction traite du contrôle de l'homéostasie énergétique par l'hypothalamus. Je détaillerai les différents noyaux hypothalamiques impliqués dans ce contrôle et décrirai la mise en place des réseaux neuronaux hypothalamiques le sous-tendant.

Dans un deuxième chapitre, je détaillerai nos connaissances relatives à la programmation métabolique adulte par un régime maternel hyperlipidique dans les modèles expérimentaux de rongeurs. Puis je décrirai l'effet cumulatif d'un environnement périnatal hyperlipidique et d'un régime hyperlipidique à l'âge adulte. Enfin, je traiterai des conséquences d'un régime maternel hyperlipidique sur le développement hypothalamique, l'inflammation et sur les modifications épigénétiques dans différents tissus de la descendance.

Le troisième chapitre sera consacré aux miARN. Je décrirai en particulier leur voie de biosynthèse, leur mode d'action, les modes de prédiction informatiques de leurs gènes cibles et enfin leur rôle au cours du développement cérébral.

INTRODUCTION

Chapitre I : HYPOTHALAMUS ET HOMEOSTASIE ENERGETIQUE

1.1. Noyaux hypothalamiques de l'homéostasie énergétique

En plus de son implication dans la régulation de l'homéostasie énergétique, l'hypothalamus est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques. *Via* ses projections aux structures extra-hypothalamiques telles que l'aire tegmentale ventrale, le striatum et l'hippocampe, l'hypothalamus est impliqué dans la régulation du système hédonique, de décision et d'apprentissage (figure 2). *Via* ses projections au tronc cérébral, il est impliqué dans la régulation du système veille/sommeil (Könner et al., 2009, pour revue Clarke, 2015).

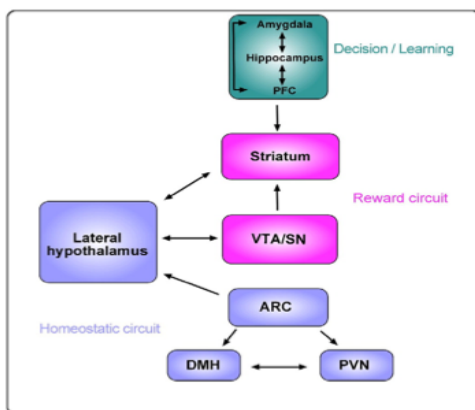
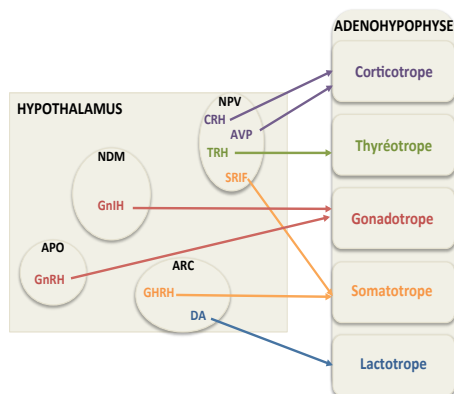


Figure 2 : Voies neuronales impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique et des systèmes de récompense, décision et apprentissage.

ARC : noyau arqué, DMH : noyau dorso-médian, PFC : cortex préfrontal, PVN : noyau paraventriculaire, SN : substance noire, VTA : aire tegmentale ventrale. Tiré de Könner et al., 2009.

Via ses projections à l'hypophyse, il est impliqué dans les fonctions de reproduction, lactation, stress et croissance (pour revue Clarke, 2015) (figure 3).

Figure 3 : Système hypothalamo-hypophysaire



Les neurones hypothalamiques émettent des projections vers l'hypophyse où ils relarguent leur neuropeptides afin de réguler cinq axes neuroendocrines ; l'axe corticotrope, l'axe thyrotrope, l'axe gonadotrope, l'axe somatotrope et l'axe lactotrope. ARC : noyau arqué, NDM : noyau dorso-médian, APO : aire pré-optique, NPV : noyau paraventriculaire, GnRH : Gonadotropin-releasing hormone, GnIH : Gonadotropin-inhibitory hormone, GHRH : Growth Hormon Releasing Hormon, DA : dopamine, SRIF : somatotropin release-inhibiting factor, TRH : thyrotropin-releasing hormone, AVP : vasopressin, CRH : Corticotropin-releasing hormone. Modifiée à partir de la revue Clarke, 2015.

L'hypophyse est une glande endocrine composée de deux lobes. La neurohypophyse reçoit l'ocytocine (OT) et la vasopressine (AVP) et les entrepose ou les relargue dans la circulation systémique. L'adénohypophyse reçoit les neuropeptides gonadolibérine (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH), dopamine, corticolibérine (Corticotropin-releasing hormone, CRH), lulibérine (Growth Hormon Releasing Hormone, GHRH), somatostatine (somatotropin release-inhibiting factor, SRIF), thyroliibérine (thyrotropin-releasing hormone, TRH) et dopamine. Ces neuropeptides stimulent la sécrétion d'hormones impliquées dans les cinq axes neuroendocrines illustrés par la figure 3.

L'hypothalamus est une structure hétérogène composée d'une dizaine de structures appelées noyaux ou aires de densité cellulaire variable (Elizondo-Vega et al., 2015). Par sa proximité au liquide céphalo-rachidien (LCR) qui contient des hormones et des métabolites (cf. paragraphe 1.2.2), l'hypothalamus reçoit les signaux provenant de la périphérie.

Six noyaux et aires participent à la régulation de l'homéostasie énergétique. Tous se situent à proximité du troisième ventricule : le noyau ventro-médian (VMN), l'aire hypothalamique latérale (AHL), l'ARC, le noyau paraventriculaire (NPV), le noyau dorso-médian (NDM) et l'EM (figure 4).

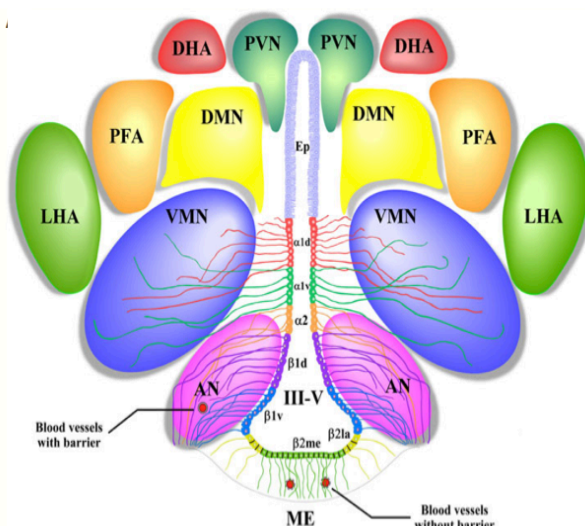


Figure 4 : Noyaux et aires hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie énergétique.

L'hypothalamus est une structure symétrique. Sept noyaux spécialisés le composent : AN : noyau arqué, DHA : aire hypothalamique dorsale, DMN : noyau dorso-médian, LHA : aire hypothalamique latérale, PFA : aire pré-fornicale, PVN : noyau paraventriculaire, VMN : noyau ventro-médian. Le troisième ventricule est bordé de tanocytes. Il en existe quatre types qui diffèrent par leur composition protéique, leur localisation autour du troisième ventricule et leur projection : $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et $\beta 1$ et $\beta 2$. Tiré de la revue : Elizondo-Vega et al., 2015.

Pour chacun de ces noyaux et aires, je détaillerai les neurotransmetteurs qu'ils expriment ainsi que les fonctions assurées par ces derniers telles qu'elles ont pu être établies par des approches de type pharmacologique, génétique ou optogénétique. Les études de type pharmacologique reposent sur l'administration intrapéritonéale (ip) ou intracérébroventriculaire (icv) de molécules à doses supra-physiologiques. L'approche génétique repose essentiellement sur la délétion de gènes (knock-out (KO)) générale, tissu ou cellule-spécifique ou une ablation de populations cellulaires. L'optogénétique repose sur une stimulation spécifique d'un type cellulaire. Les injections ip ou les KO généraux ne permettent pas de démontrer le rôle direct des neurotransmetteurs dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Tandis que les injections icv, les KO spécifiques et l'optogénétique permettent de définir leur implication.

1.1.1. Noyau arqué (ARC)

L'ARC, de par sa position à la base du troisième ventricule et son association à l'assise formée par les tanocytes (cf. paragraphe 1.2.2), est le premier senseur des signaux périphériques qu'il relaye aux autres structures hypothalamiques et extra-hypothalamiques.

L'ARC contient plusieurs populations neuronales dont deux sont principalement impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique ; les neurones anorexigènes POMC/CART co-sécrétant l' α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) et la cocaine-and-amphetamine-regulated transcript (CART), et les neurones orexigènes NPY/AgRP co-sécrétant le neuropeptide Y (NPY) et l'Agouti-related peptide (AgRP). L'ARC contient également une population neuronale impliquée essentiellement dans le contrôle des fonctions de reproduction et co-exprimant les neuropeptides kisspeptine (KISS1), neurokinine B (NKB) et dynorphine (Dy), nommés neurones KNDy. Ces neurones KNDy sont potentiellement également impliqués dans le contrôle de la balance énergétique (Hill et al., 2008, Backholer et al., 2010, Tolson et al., 2014). Le noyau arqué contient également une autre population de neurones sécrétant le neuropeptide GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) impliqué dans la sécrétion de GH (Growth Hormone) (pour revue Clarke, 2015). L'ARC contient une dernière population neuronale, les neurones dopaminergiques projetant vers l'éminence médiane. La dopamine est relarguée au niveau du système porte hypophysaire et inhibe la sécrétion de prolactine.

1.1.1.1. Neurones POMC/CART

L' α -MSH appartient à la famille des mélanocortines codées par le gène *Pomc*. Elle est impliquée dans l'inhibition de la prise alimentaire et l'augmentation des dépenses énergétiques via le système mélanocortine (SM) (pour revue Sobrino Crespo et al., 2014, Van Swieten et al., 2014, Nuzzaci et al., 2015). Le système mélanocortine est une importante voie de régulation du comportement alimentaire. Ce système inclut les neurones exprimant les récepteurs MC3R et MC4R, les neurones exprimant l' α -MSH, agoniste des MCR et les neurones exprimant l'AgRP, antagoniste des MCR (pour revue Nuzzaci et al., 2015). Les récepteurs MC3R et MC4R sont fortement exprimés au sein du SNC et plus particulièrement dans les aires et noyaux impliqués dans la régulation de la balance énergétique (Kishi et al., 2003, Aponte et al. 2011, Jeong et al., 2014, pour revue Nuzzaci et al., 2015). Chez l'homme, 4% des obésités morbides présentent une mutation du gène *Mc4r* (Vaisse et al., 2000). Par ailleurs, la délétion générale du récepteur MC4R produit des souris obèses, hyperinsulinémiques et hyperglycémiques (Huszar et al., 1997). Une mutation du gène *Pomc* chez l'homme entraîne une obésité (Krude et al. 1998). Chez la souris, la délétion générale du gène *Pomc* entraîne un surpoids et une hyperleptinémie à 3 mois (Yaswen et al., 1999, Smart et al., 2006). Réciproquement chez la souris, une stimulation continue des neurones POMC durant 24 heures induit une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Aponte et al., 2011).

CART est codé par le gène *Cartpt*. Le récepteur de CART n'est à ce jour pas encore déterminé (pour revues Subhedar et al., 2014, Lau et al., 2014). La délétion générale du gène *Cart* induit un surpoids de 14% à 40 semaines chez la souris et un dysfonctionnement des cellules pancréatiques. Ces souris secrètent moins d'insuline et sont intolérantes au glucose sans impact sur la prise alimentaire (Wierup et al., 2005). Le neuropeptide CART est impliqué dans le maintien d'un poids corporel stable et dans la régulation du métabolisme glucidique en stimulant la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques.

1.1.1.2. Neurones NPY/AgRP

L'AgRP est produit à partir du gène *Agrp*. Ce neuropeptide a un rôle orexigène (Sohn et al., 2012). Une ablation spécifique des neurones AgRP mène à une hypophagie associée à une perte de poids significative (Gropp et al. 2005, Luquet et al. 2005). A l'inverse, une

stimulation continue durant 24 heures des neurones AgRP augmente instantanément la prise alimentaire (Aponte et al., 2011).

NPY appartient à la famille des protéines neuropeptides Y, comprenant également les peptides pancréatiques YY et PP. Ces peptides sont codés par le gène *Npy*. Ces trois peptides interagissent avec leurs récepteurs Y dont il existe 6 isoformes Y1 à 6 (Nguyen et al., 2012, Parker et al., 2012). La délétion générale du gène *Npy* n'a aucun impact sur le poids, la prise alimentaire ou l'adiposité des souris adultes. Les taux plasmatiques de glucose et d'insuline sont également normaux. Lors d'une injection de leptine, ces souris délétées pour *Npy* répondent de manière similaire aux souris C avec une diminution du poids corporel, de la prise alimentaire et du tissu adipeux (Erickson et al., 1996). Un jeûne de 48h induit chez la souris une augmentation de la prise alimentaire suivie d'une augmentation d'expression de NPY. La délétion générale du récepteur Y1 chez la souris n'implique aucune modification du poids corporel ou du comportement alimentaire alors qu'une délétion générale du récepteur Y5 augmente le poids corporel et la prise alimentaire (Marsh et al., 1998, Pedrazzini et al., 1998, Higuchi et al., 2008). Ces résultats démontrent que NPY pourrait avoir une action sur la balance énergétique *via* son récepteur Y5.

1.1.1.3. Neurones KNDy

Les neurones KNDy émettent des projections vers l'EM où ils forment des synapses avec les axones des neurones à GnRH. Selon les espèces, les corps cellulaires de ces neurones proviennent de l'aire pré-optique (APO) ou de l'hypothalamus médio-basal (pour revue Yin et al., 2010). Au niveau de l'EM, les neurones KNDy régulent l'exocytose et la sécrétion de GnRH. Cette sécrétion contrôle à son tour la sécrétion des gonadotrophines LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculo-stimulante) *via* l'axe hypothalamo-hypophysaire (Ezzat et al., 2015). Une injection icv de KISS1 stimule la sécrétion de LH (Ezzat et al., 2015). Une injection dans l'ARC de l'anti-sens de KISS1 chez des rates ovariectomisées diminue la fréquence pulsatile de LH et le nombre de cycles oestriens (True et al., 2010, Beale et al. 2013, Ezzat et al., 2015). L'action de KISS1 *via* son récepteur 54 couplé à la protéine G (G-Protein Coupled Receptor 54, GPR54) semble essentielle pour maintenir une fertilité. Chez la souris et l'humain, la perte de fonction de GPR54, KISS1 ou NK3R (le récepteur de la NKB) mènent à une diminution du niveau

d'expression de LH et FSH et à un retard du développement pubertaire (Mittelman-Smith et al., 2012, Beale et al., 2013, Navarro, 2013, Skorupskaite et al., 2014).

Il existe une forte corrélation entre balance énergétique et fonctions de reproduction. Une balance énergétique défavorable, causée par un jeûne ou au contraire un régime hyperlipidique, est associée à une modification des taux de gonadotrophines et à une altération de la fertilité (Tortoriello et al., 2004, Pasquali et al., 2007, Luque et al., 2007, Ghanayem et al., 2010, True et al., 2010, De Bond et al., 2014). L'ovariectomie chez des rates provoque un surpoids et une augmentation des gonadotrophines. L'ablation des neurones KNDy chez ces rates contrecarre les effets de l'ovariectomie en restaurant un niveau normal de gonadotrophines et en atténuant le surpoids. (Mittelman-Smith et al., 2012) (figure 5). Par ailleurs, des souris KO pour GPR54 présentent un surpoids, une hyperleptinémie et une intolérance au glucose (Tolson et al., 2014). Des études d'immunohistochimie suggèrent une communication entre les neurones KNDy et les neurones POMC/CART et NPY/AgRP. Les terminaisons axonales des neurones KNDy sont en effet apposées aux corps cellulaires des neurones POMC/CART et NPY/AgRP. Réciproquement, les terminaisons de ces deux populations neuronales sont apposées aux corps cellulaires des neurones KNDy (Backholer et al., 2010). Par ailleurs des études d'électrophysiologie ont montré que KISS1 est capable d'exciter les neurones POMC/CART *via* le récepteur GPR54 et d'inhiber indirectement les neurones NPY/AgRP *via* les neurones GABAergiques (Fu et al., 2010).

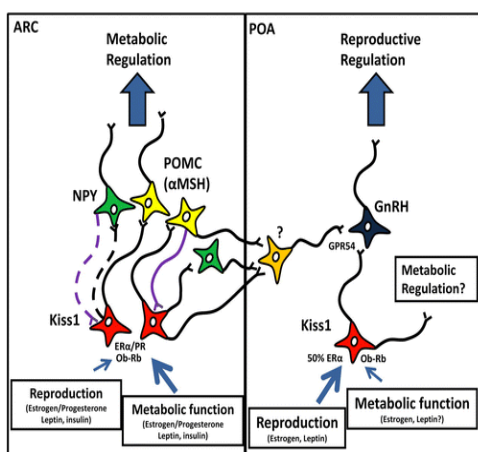


Figure 5 : Métabolisme et fonction de reproduction

Au sein de l'ARC, les neurones KISS1 détectent les signaux périphériques et participent avec les neurones NPY et à la régulation du métabolisme énergétique. Au sein de l'Aire pré-optique (POA), les neurones KISS1 détectent les signaux périphériques et informent les neurones GnRH afin de réguler les fonctions de reproduction. KISS1 : kisspeptine, NPY : neuropeptide Y, POMC : pro-opiomélanocortine, α -MSH : hormone mélanotrope, ObRb : récepteur à la leptine, ER α et PR : récepteur aux œstrogènes et à la progestérone, GnRH : gonadolibérine, GPR54 : récepteur aux kisspeptines. Tiré de Backholer et al., 2010.

1.1.1.4. Afférences et efférences de l'ARC

Les afférences et efférences des neurones POMC et AgRP ont fait l'objet d'une étude récente montrant que ces neurones aux fonctions antagonistes présentent des profils de projection similaires. La densité d'afférences ainsi que la densité cellulaire de chaque noyau ont été établies. 60 à 70% des afférences proviennent d'autres noyaux hypothalamiques incluant le NPV, le NDM, le NVM, le noyau supraoptique, l'hypothalamus latéral, l'hypothalamus antérieur, l'hypothalamus postérieur et l'aire préoptique latérale tandis que 30 à 40% des afférences proviennent de structures extra-hypothalamiques incluant l'hippocampe, le raphe median et le noyau mammillaire median (figure 6). Aucune afférence ne provient du NTS (Wang et al., 2015).

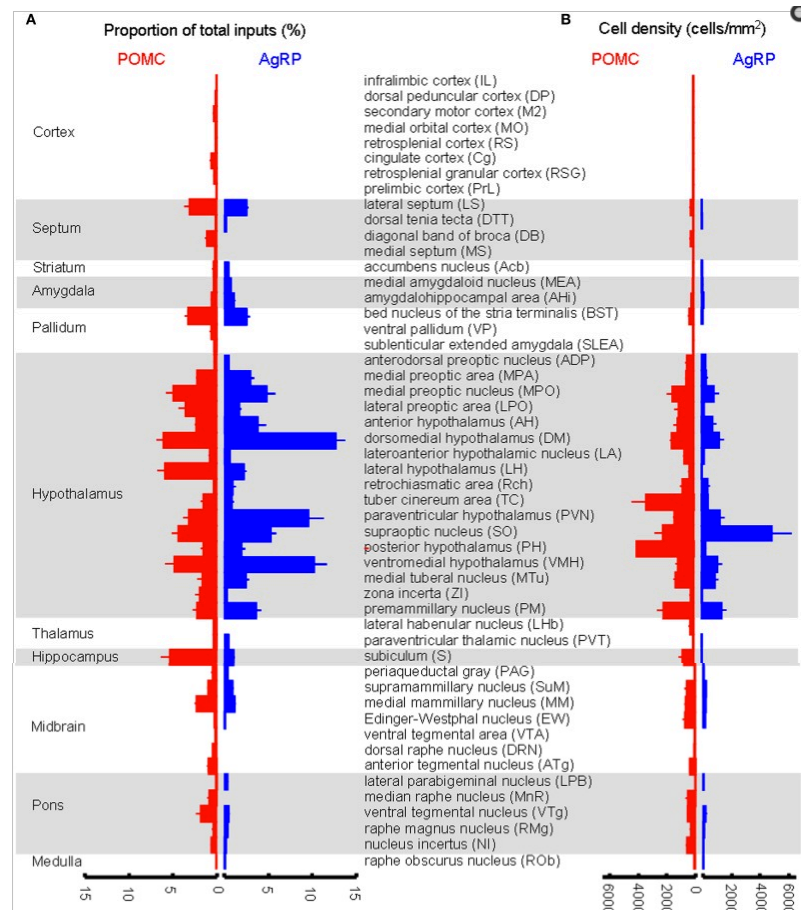


Figure 6 : Afférences des neurones POMC et AgRP de l'ARC.

A. Pourcentage des afférences des neurones POMC et des neurones AgRP. B. Densité cellulaire des afférences aux neurones POMC et AgRP.

Le pourcentage d'afférence est représenté par la normalisation du nombre de cellules de chaque noyau ou aire par le nombre total d'afférences. Tiré de Wang et al., 2015.

Les efférences des neurones POMC et AgRP de l'ARC sont principalement intra-hypothalamiques (figure 7). Des efférences contactent également le noyau accumbens, le septum latéral et le colliculus supérieur. Au cours de la même étude, les auteurs ont caractérisé les efférences des neurones POMC du NTS qui sont dirigées vers l'hypothalamus, le noyau accumbens et le noyau subcoeruleus (Wang et al., 2015)

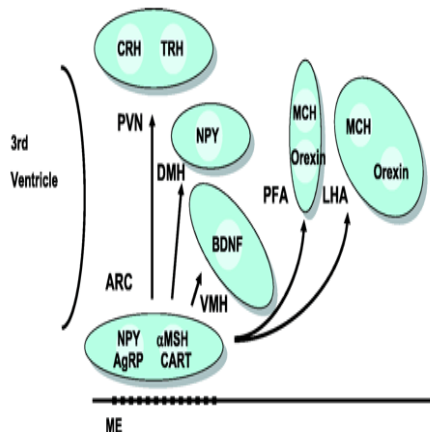


Figure 7 : Efférences des neurones POMC/CART et NPY/AgRP de l'ARC au sein de l'hypothalamus

Les neurones POMC/CART et NPY/AgRP émettent des projections vers plusieurs noyaux hypothalamiques ; le NPV, NDM, NVM, l'aire préfor nicale et l'AHL. ARC : noyau arqué, PVN : noyau paraventriculaire, DMH : noyau dorso-médian, VMH : noyau ventro-médian, PFA : aire préfor nicale, LHA : aire hypothalamique latérale, ME : éminence médiane, NPY : neuropeptide Y, AgRP : agouti-related protein, α -MSH : hormone mélanotrope, CART : cocaine-and amphetamine-regulated transcript, CRH : corticolibérine, TRH : thyroli bérine, BDNF : Brain-derived neurotrophic factor, MCH : hormone de mélanoc concentration, Tirée de la revue : Wynne et al., 2005.

Les neurones POMC/CART et NPY/AgRP constituent les premiers neurones senseurs des signaux périphériques et sont qualifiés de neurones de premier ordre. Les neurones du NPV tout comme ceux de l'AHL sont qualifiés de neurones de second ordre puisqu'ils constituent le deuxième relais des signaux périphériques (Jobst et al., 2004).

1.1.2. Noyau paraventriculaire (NPV)

Le NPV contient deux types de neurones, les neurones magnocellulaires et les neurones parvocellulaires. Les neurones parvocellulaires se répartissent en deux populations impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Les neurones CRH sécrètent la corticolibérine ou corticotropin-releasing hormone (CRH) ; les neurones TRH sécrètent l'hormone thyroé tropique ou thyrotropin-releasing hormone (TRH). Les neurones magnocellulaires se répartissent également en deux populations principalement impliquées dans les fonctions de reproduction et de mise bas/accouchement, les neurones OT, sécrétant l'ocytocine (OT) et les neurones AVP sécrétant la vasopressine (AVP) (pour revue Hill, 2012).

1.1.2.1. *Neurones TRH*

La TRH stimule la synthèse et la sécrétion de la thyroïdostimuline (TSH), une hormone hypophysaire, qui elle-même contrôle la synthèse des hormones thyroïdiennes. Celles-ci participent à la régulation de la thermogenèse et de la prise alimentaire (pour revue Hill, 2012). La TRH agit via ses récepteurs TRH-R1 et TRH-R2 (Itadani et al., 1998) localisés dans différents noyaux hypothalamiques, le NPV, l'ARC, l'AHL, l'APO, l'aire périventriculaire et structures extra-hypothalamiques, le cortex, l'hypophyse et le bulbe olfactif (Ebling et al., 2008, Zabavnik et al., 1993). En cas de surnutrition durant la période de lactation, les rats présentent un surpoids et une diminution de la synthèse de la préprotéine TRH au sevrage (Aréchiga-Ceballos et al., 2014). Le KO général du gène *Trh* montre à la naissance des cellules thyroïotropes normales ainsi qu'un taux normal de sécrétion d'hormone thyroïdienne (T4) (Shibusawa et al., 2000). A quatre semaines ces souris accusent un retard de croissance de 30%. Néanmoins, ce retard est aboli à huit semaines. Ces souris présentent un taux de T4 diminué de 60% et un taux de TSH doublé provoquant une hypothyroïdie. Elles montrent également une hyperglycémie à jeun (+100%) mais une insulino-sensibilité « normale » suite à un test de tolérance à l'insuline suggérant que l'hyperglycémie est due à une altération de sécrétion d'insuline. La morphologie des ilots du pancréas est normale ainsi que leur contenu et leur sécrétion d'insuline en réponse à une injection de 5 mM de glucose. Néanmoins, la sécrétion d'insuline est diminuée en réponse à une injection de 10 ou 20 mM (Yamada et al., 1997). Ces résultats démontrent que la TRH est spécifiquement impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique chez le rongeur. La délétion générale du récepteur TRH-R1 chez la souris provoque une hypothyroïdie, une diminution du poids corporel et de la prise alimentaire de 10% (Mayerl et al., 2015). Ces résultats montrent que le récepteur TRH-R1 est impliqué dans la régulation de la balance énergétique.

1.1.2.2. *Neurones CRH*

La CRH stimule la sécrétion de l'adénocorticotrophine (ACTH) par l'hypophyse qui elle-même contrôle la sécrétion de glucocorticoïdes par la glande surrénale. La CRH agit via deux types de récepteurs CRH-R1 et CRH-R2 (Mo et al., 2015). Ces récepteurs sont exprimés dans différents noyaux hypothalamiques tels que l'ARC, le NPV, l'AHL, le NDM, le noyau supraoptique et structures extra-hypothalamiques telles que l'hypophyse,

l'hippocampe et le système olfactif (Van Pett et al., 2000, Chen et al., 2005). Une injection icv de CRH, entraîne un moindre gain de poids, une diminution de l'activité locomotrice et de la thermogénèse adipocytaire (Buwalda et al., 1998). La délétion générale du gène *Crh* entraîne une diminution du tissu adipeux blanc de moitié entre 4 et 6 mois (Muglia et al., 2000) ainsi qu'une augmentation d'activité des neurones OT du PVN (Pirnik et al., 2009). Ces résultats montrent que la CRH possède un rôle dans l'activation des neurones OT sans rôle direct dans la régulation de la balance énergétique. La délétion du récepteur CRH-R1 dans des cellules pré-adipocytaires produit des souris résistantes à un régime obésogène et intolérantes au glucose (Lu et al., 2015). Bien que la CRH ne semble pas être impliquée directement dans la régulation de la balance énergétique, son récepteur CRH-R1 en est un acteur.

1.1.2.3. Neurones ocytocine (OXT)

L'OT est connue pour son implication dans la régulation de la mise bas, de la lactation, dans le comportement maternel et la sociabilité. Elle possède également un rôle dans l'inhibition de l'axe corticotrope en réponse au stress. Elle agit *via* son récepteur OXTR exprimé dans plusieurs structures cérébrales dont l'hypothalamus, l'hippocampe et le tronc cérébral. Au niveau périphérique OXTR est exprimé dans l'utérus, les glandes mammaires, le rein et le pancréas selon les espèces (pour revue Baribeau et al., 2015). Plusieurs équipes ont étudié l'éventuelle participation de l'OXT dans la régulation de la balance énergétique. A dose supra-physiologique, l'OXT exerce un effet satiétogène. Une injection ponctuelle ip ou icv d'OXT diminue la prise alimentaire et la durée des repas chez le rat. A l'inverse, lorsque ces animaux sont prétraités avec un antagoniste de l'OXT, les effets inhibiteurs de l'OXT sont contrecarrés et la prise alimentaire est même stimulée (Arletti et al., 1989, pour revue Gimpl et al., 2001). L'OXT possède un rôle anorexigène à dose supra-physiologique.

1.1.2.4. Neurones vasopressine (AVP)

L'AVP est connue pour son rôle antidiurétique et vasoconstricteur. Elle intervient également dans la régulation du métabolisme glucidique (Nakamura et al., 2009). Cette dernière agit *via* ses trois récepteurs V1a, V1b et V2. Le récepteur V1a est principalement

exprimé dans le foie et le SNC, le récepteur V1b dans l'hypophyse et le récepteur V2 dans les reins (pour revue Baribeau et al., 2015). Une injection ip d'AVP diminue la prise alimentaire de manière dose-dépendante (Langhans et al., 1991, Sobrino Crespo et al., 2014). La délétion générale de V1a provoque à 21 semaines un surpoids et une intolérance au glucose chez le rat nourri avec un régime hyperlipidique alors que la délétion générale de V1b provoque une diminution du poids corporel, une hypoglycémie et une hypoinsulinémie. La double délétion des récepteurs V1a et V1b induit un surpoids, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie montrant une intolérance au glucose sous régime standard et hyperlipidique. La double délétion induit les mêmes altérations métaboliques que la délétion du récepteur V1a qui semble être prédominant (Nakamura et al., 2009). *Via* ses récepteurs V1a et V1b, l'AVP agit comme un des modulateurs de l'homéostasie glucidique.

1.1.2.5. Afférences et efférences du NPV

Les neurones du NPV reçoivent des afférences neuronales de l'ARC, l'AHL, l'organe subfornical ou encore l'aire pré-optique médiane. Mais également de structures extra-hypothalamiques telles que le NTS ou le noyau supra-chiasmatique (pour revue Hill, 2012). Ils émettent des efférences vers les neurones des systèmes sympathique et parasympathique. Plus spécifiquement, Les neurones CRH et TRH émettent des projections vers NTS ou le noyau moteur dorsal (Elmqvist et al., 1998).

1.1.3. Aire hypothalamique latérale (AHL)

L'AHL a été identifiée comme le « centre de la faim » par Stellar en 1954 après des études de lésions et de stimulations hypothalamiques. Elle contient une population neuronale co-exprimant ; les orexines A et B (ORX A et B ou initialement connues sous le nom d'hypocrétine), une population exprimant l'hormone de mélano-concentration (MCH) impliquées toutes deux dans la régulation de la prise alimentaire et une population exprimant la neurotensine (Nts) impliquée dans la régulation du système veille/sommeil (Furutani et al., 2013, pour revue Brown et al., 2015).

1.1.3.1. *Neurones ORX*

Les ORX A et B ont initialement été caractérisées comme des neuropeptides clés de la régulation du comportement alimentaire, plus particulièrement dans l'initiation de la prise alimentaire et de la prise de boisson. Ces neuropeptides sont maintenant reconnus pour leur implication dans la régulation du statut veille/sommeil (pour revue Willie et al., 2001, Nuñez et al., 2009). Les ORX possèdent deux récepteurs, OX1R et OX2R. L'OX1R est exprimé dans l'hypothalamus et plus particulièrement dans le NPV, le NVM, l'ARC ainsi que dans l'hippocampe, le noyau du raphé et le locus coeruleus. L'OX2R est exprimé dans le NDM, le NPV, l'ARC, le NVM ainsi que dans le cortex cérébral et l'hippocampe (pour revue Willie et al., 2001). Une injection icv d'ORX augmente la prise alimentaire de manière dose-dépendante et l'activité locomotrice (Dube et al., 1999, Nakamura et al., 2000, Willie et al., 2001). La sécrétion d'ORX est stimulée par une période de jeûne (pour revue Jobst et al., 2004, Sakurai et al., 1998). La délétion générale du gène *Orex* induit durant la phase nocturne une augmentation de l'activité locomotrice et de la thermogénèse (Kaur et al., 2008). En cas de jeûne, ces souris perdent moins de poids que les souris WT et diminuent leur activité locomotrice (Gunapala et al., 2011). Les ORX apparaissent impliquées dans la régulation des dépenses énergétiques.

1.1.3.2. *Neurones MCH*

MCH est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Chez le rongeur, il agit via son récepteur MCHR-1 (Chee et al., 2014) exprimé dans l'hypothalamus, plus particulièrement dans le NPV, l'ARC, l'AHN, le NDM et le NVM ainsi que dans le cortex, l'hippocampe, le noyau accumbens, le cervelet et le striatum (Chee et al., 2013). Une injection icv de MCH à des rats rassasiés produit une rapide augmentation de la prise alimentaire de manière dose-dépendante (Della-Zuana et al., 2002). Une icv continue sur 14 jours induit une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel ainsi qu'une diminution des dépenses énergétiques et de la température corporelle (Glick et al., 2009). Une délétion générale du gène *Mch* chez la souris induit une hypophagie, une diminution du poids corporel et une augmentation des dépenses énergétiques (Shimada et al., 1998, Kokkotou et al., 2005, pour revue Macneil, 2013). Une délétion générale de MCHR-1, provoque de manière étonnante une hyperphagie. Cependant ces souris sont résistantes aux

régimes obésogènes et maintiennent un poids corporel similaire aux souris WT en raison de leur hyperactivité (Chen et al., 2002, Marsh et al., 2002, pour revue Macneil, 2013, Chee et al., 2014). Le neuropeptide MCH est un neuropeptide orexigène impliqué dans la stimulation de la prise alimentaire et la diminution des dépenses énergétiques.

1.1.3.3. Afférences et efférences de l’AHL

Les afférences de l’AHL proviennent d’aires cérébrales impliquées dans les phénomènes de récompense, de motivation, d’apprentissage et de mémoire tels que le cortex orbito-frontal, le noyau acumbens, l’aire tegmentale ventrale (ATV), ainsi que d’aires associées aux afférences sensorielles telles que les cortex olfactif et insulaire. Elle reçoit également des afférences du tronc cérébral qui est associé aux afférences sensorielles motrices, aux afférences vagales, viscérales et à l’éveil (le NTS, le noyau parabrachial et le locus coeruleus).

Les neurones de l’AHL émettent des efférences au sein de l’hypothalamus vers le NDM, l’ARC, le NPV et également vers le NTS, le noyau parabrachial, le noyau accumbens et l’ATV (Dube et al., 1999, Jobst et al., 2004, Van Swieten, 2014, pour revue Brown et al., 2015). Par ailleurs, les neurones de l’AHL émettent également des projections vers des organes périphériques comme les glandes salivaires, les muscles masséter ou la langue (Pérez et al., 2011).

1.1.4. Noyau ventro-médian (NVM)

Le NVM a initialement été identifié comme le « centre de la satiété » par Stellar en 1954 en opposition à l’AHL identifiée comme « centre de la faim ». Une lésion bilatérale de ce noyau induisait une hyperphagie et une obésité. En accord avec ces résultats, des études plus récentes montrent que la stimulation électrique du NVM diminue la prise alimentaire (pour revue Schwartz et al., 2000). Le NVM contient des populations neuronales sécrétant le facteur de transcription steroidogenic factor 1 (SF-1) et le brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Tous deux impliqués dans la régulation de l’homéostasie énergétique.

1.1.4.1. **Neurones SF-1**

Le facteur de transcription SF-1 est requis au cours de développement embryonnaire pour la formation et la migration neuronale du NVM. SF-1 est nécessaire à la différenciation et au maintien de ces populations neuronales après la naissance (Tran et al., 2003, Kurrasch et al., 2007). Le KO général du gène *Sf-1* est responsable d'une altération de la structure du NVM chez la souris (Ikeda et al., 1995) et de ses efférences neuronales. D'un point de vue physiologique, cette délétion mène à une augmentation du poids corporel de 50% et une diminution de l'activité physique (Majdic et al., 2002, Tran et al., 2003, Büdefeld et al., 2013). Le facteur de transcription SF-1 apparait impliqué dans la régulation des dépenses énergétiques.

1.1.4.2. **Neurones BDNF**

Le BDNF est un facteur neurotrophique fortement exprimé au niveau central et principalement connu pour son implication dans le développement et la plasticité neuronale (Barde, 1994). Le BDNF est impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Il agit via son récepteur tyrosine récepteur B (TrkB) (pour revue Van Swieten et al., 2014). Une injection icv de BDNF dans le NVM inhibe l'activité des neurones NPY de l'ARC menant à une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Xu et al., 2013). Le KO du gène *Bdnf* dans l'ensemble des neurones produit des souris obèses, hyperléptinémiques, hyperglycémiques et hyperinsulinémiques (Rios et al. 2001). Le BDNF est régulé par le statut nutritionnel de l'organisme. Une fois activés par les signaux périphériques, ils stimulent l'expression d' α -MSH par les neurones de l'ARC et induit une diminution du poids corporel et de la prise alimentaire (Blouet et al., 2010). Le BDNF est impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique et des métabolismes glucidique et lipidique.

1.1.4.3. **Afférences et efférences du NVM**

Les neurones BDNF reçoivent des afférences inhibitrices des neurones NPY de l'ARC et activatrices des neurones α -MSH (pour revue Van Swieten et al., 2014). Ils émettent des

efférences vers le NPV, le NDM, l'ARC et le NVM (Xu et al., 2013, pour revue Van Swieten et al., 2014).

Les neurones SF-1 émettent des efférences vers le NPV, l'AHL, le NDM et l'aire pré-optique. Au niveau extra-hypothalamique, les efférences de ces neurones sont dirigées vers l'amygdale antérieure et le thalamus (Krieger et al., 1979, King, 2006, Kurrasch et al., 2007, Kim et al., 2011).

1.1.5. Noyau dorso-median (NDM)

Le rôle du NDM n'est pas encore clairement établi, néanmoins il a été montré qu'il exprime de nombreux neurotransmetteurs caractéristiques du contrôle de l'homéostasie énergétique. Ces neurotransmetteurs incluent la cholecystokinine (CCK), le BDNF, le NPY, l'AgRP, l'ORX, le MCH, le CART ou encore le CRH (King, 2006, Kurrasch et al., 2007, Kim et al., 2011). Ce qui laisse supposer un rôle dans la régulation de divers processus biologiques tels que la prise alimentaire, la reproduction, la thermogenèse, la réponse au stress et le rythme circadien (Groessl et al., 2013).

1.1.5.1. Neurones NPY

Une augmentation d'expression de NPY dans le NDM est observée chez les rats OLETF (hyperphagiques, obèses et diabétiques), sans modification du taux de NPY dans l'ARC. Une restriction alimentaire sévère ou une augmentation d'activité physique augmentent également le taux d'expression de NPY dans le NDM (Bi et al., 2001, Bi, 2007, Bi et al., 2012). Son expression est sous le contrôle de la CCK (Bi et al., 2003). La diminution d'expression du gène *Npy* par une technique d'ARN interférence spécifiquement dans les neurones du NDM de rat sous régime hyperlipidique diminue la prise alimentaire et le poids corporel. Ces rats montrent une amélioration de leur tolérance au glucose et de leur sensibilité à l'insuline (Chao et al., 2011, pour revue Bi et al., 2012, Kim et Bi, 2015). Les neurones NPY du NDM sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme glucidique en conditions extrêmes.

1.1.5.2. Afférences et efférences du NDM

Les neurones NPY du NDM émettent des efférences vers l'ARC, le NPV, l'AHL, le noyau supra-chiasmatique, l'aire pré-optique et la région préfor nicale (Thompson et al., 1996, Lee et al., 2012, Bi, 2013).

1.1.6. Eminence médiane (EM)

L'éminence médiane est une structure très vascularisée, exclusivement composée de terminaisons nerveuses issues de plusieurs noyaux hypothalamiques et de cellules gliales. Elle est dépourvue de corps cellulaires neuronaux. Les terminaisons nerveuses sont localisées à proximité du système porte hypothalamo-hypophysaire vers lequel elles relarguent leurs neuropeptides qui seront transmis à l'adénohypophyse (pour revue Yin et al., 2010, Musumeci et al., 2015). L'efficacité de transmission de ces neuropeptides est dépendante de l'arrangement structural de l'EM (Clarke et al., 2015). L'EM ne produit pas de neurotransmetteurs mais intègre les signaux et les transfère à l'hypothalamus médio-basal.

1.2. Hypothalamus et intégration des signaux périphériques

Les facteurs hormonaux et les métabolites circulants entrent au niveau hypothalamique via la BHE, les capillaires fenestrés des organes circumventriculaire dont fait partie l'EM et les plexus choroïdes sécrétant le liquide céphalo-rachidien.

1.2.1. Intégration via la BHE

La BHE constitue une interface entre le sang et le cerveau permettant de protéger ce dernier des agents périphériques toxiques, de contrôler les échanges entre les deux compartiments et ainsi de maintenir une homéostasie cérébrale. Elle est composée de plusieurs types cellulaires ; les cellules endothéliales, les péricytes, les astrocytes et les macrophages. Les cellules endothéliales de la BHE ont des spécificités structurales. Ces cellules possèdent des jonctions serrées assurant une étanchéité du parenchyme nerveux notamment par rapport à de nombreuses substances. Le passage de ces substances requière

la présence de transporteurs spécialisés dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Mullier et al., 2010, Langlet, 2014, Blanchette et al., 2015).

La BHE est présente dans l'ensemble de l'hypothalamus excepté au niveau de l'EM. Cette dernière possède des capillaires sanguins fenestrés facilitant la perméabilité des cellules endothéliales à certaines substances périphériques. Des études récentes de traçage ont montré qu'une injection intracardiaque du traceur de faible poids moléculaire FITC (390 Da) colore l'EM après 5 minutes.

1.2.2. Intégration via le LCR et les tanocytes

Les tanocytes sont des cellules gliales à l'interface du LCR et des noyaux hypothalamiques. Leur corps cellulaires bordent le troisième ventricule et leurs prolongements atteignent l'EM, l'ARC, le NDM et le NVM (figure 8) (Rodríguez et al., 2005, Elizondo-Vega et al., 2015).

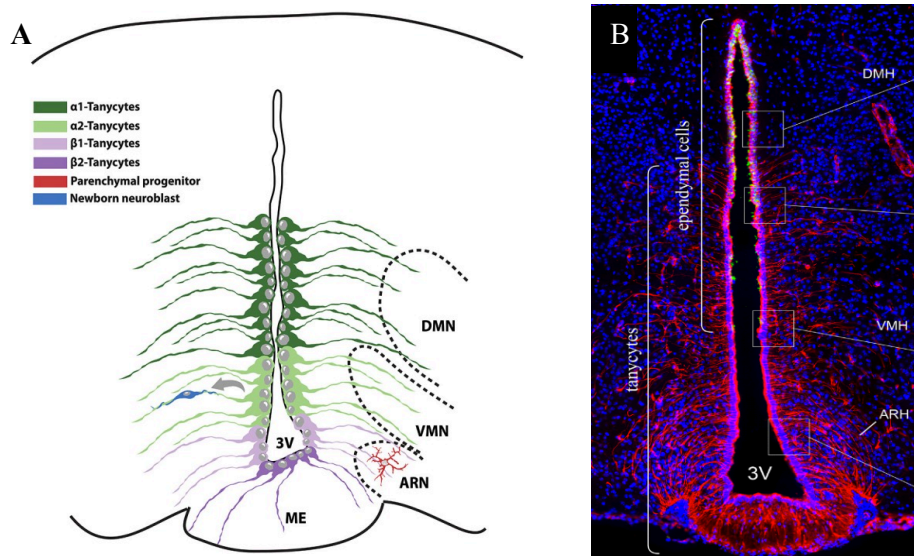


Figure 8 : Organisation des tanocytes au sein de l'hypothalamus médio-basal
A. Schéma de l'organisation des tanocytes. B. Immunocoloration des tanocytes.

La partie médiane du 3^{ème} ventricule contient les tanocytes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ qui émettent des projections vers le NVM et l'ARC. Les tanocytes $\beta 1$ et $\beta 2$ résident au niveau du plancher du 3^{ème} ventricule et émettent des projections dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. DMH : noyau dorso-médian, VMN ou VMH : noyau ventro-médian, ARN ou ARC : noyau arqué, 3V : 3^{ème} ventricule, ME : éminence médiane, tc : tanocytes, ec : cellules ependymales. Tiré des revues : Dale, 2011 et Maggi et al., 2015.

Il existe quatre types de tanocytes qui diffèrent par leur localisation, leur morphologie et la composition protéique de leurs jonctions serrées ; les tanocytes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont localisés dans la partie médiane de l'hypothalamus et projettent vers les NDM et NVM pour les tanocytes $\alpha 1$ et l'ARC pour les tanocytes $\alpha 2$. Les tanocytes $\beta 1$ s'étendent vers l'ARC et forment une barrière entre l'EM et l'ARC. Les tanocytes $\beta 2$ se projettent vers l'EM. Ces derniers sont associés au système porte hypothalamo-hypophysaire et forment une barrière entre le LCR et l'EM (figure 8) (Mullier et al., 2010, pour revue Robriguez et al., 2010, Bolborea et al., 2013, pour revue Maggi et al., 2015).

L'injection intraveineuse d'une série de traceurs dont le bleu d'Evans, un traceur de faible poids moléculaire (961 Da), colore uniquement l'EM tandis qu'une injection icv colore uniquement l'ARC. Il existe donc un échange de solutés entre le LCR et l'ARC et l'existence d'une barrière entre les noyaux et aires hypothalamiques.

L'équipe de Prévot démontre qu'une ip de leptine fluorescente est dans un premier temps détectée au niveau de l'EM et de ces tanocytes, 5 minutes après l'injection puis au niveau de l'ARC après 15 minutes (Balland et al., 2014). Après l'injection d'un anticorps neutralisant la leptine dans le LCR, la leptine n'est diffusée que faiblement dans l'hypothalamus médio-basal.

La leptine intègre le SNC par les capillaires sanguins se trouvant à la base de l'EM puis est intégrée par les prolongements tanocytaires et diffuse le long du tanocyte jusqu'au corps cellulaire bordant le troisième ventricule (Balland et al., 2014). La leptine est transportée et relarguée par des tanocytes en culture via la voie de signalisation ERK. L'injection d'un inhibiteur de la voie ERK, U0126, induit une accumulation de leptine dans les tanocytes. Par ailleurs, l'activation de la voie ERK par l'EGF chez des souris obèses restaure le transport de la leptine dans l'hypothalamus médio-basal.

L'ensemble de ces résultats a suggéré à Balland que la leptine plasmatique est libérée dans le troisième ventricule par les tanocytes de l'EM via la voie de signalisation ERK ce qui lui permet d'être captée par les tanocytes de l'ARC et ainsi d'être diffusée dans l'hypothalamus ventro-médian (Mullier et al., 2010, Balland et al., 2014).

1.2.3. Statut énergétique de l'organisme et intégration des signaux périphériques

La perméabilité de la BHE et de l'EM peuvent être modulées par le statut nutritionnel de l'organisme et ainsi faciliter ou freiner le passage de nutriments et d'hormones à l'ARC (Schaeffer et al., 2013). Une baisse de la glycémie chez les souris est perçue par les

tancytes qui induisent l'expression de VEGFA. L'expression de ce dernier a pour effet la fenestration des capillaires irriguant l'ARC (Langlet et al., 2013, Prevot et al., 2013). Par ailleurs, le niveau de neurogenèse est cinq fois plus important au sein de l'EM que dans d'autres régions hypothalamiques. Ces nouveaux neurones dérivent des tancytes $\beta 2$ de l'EM (Lee et al., 2012). Par ailleurs, une inhibition par irradiation de la neurogenèse dans l'hypothalamus ventro-median des souris sous régime HF atténue le gain de poids et augmente l'activité physique. Ces résultats suggèrent que la neurogenèse dans l'EM induite par une surnutrition diminue les dépenses énergétiques et favorise le stockage énergétique (Lee et al., 2012, Prevot et al., 2013, Langlet et al., 2013, Van Swieten et al., 2014).

1.3. Ontogenèse hypothalamique

La communication entre les différents noyaux et aires hypothalamiques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique est fonctionnelle grâce à la bonne organisation des réseaux neuronaux hypothalamiques. L'ontogenèse de ces réseaux a lieu durant une période critique du développement.

Chez les rongeurs, l'expression des neuropeptides hypothalamiques a lieu durant les deuxièmes et troisièmes semaines de gestation. Les projections de l'ARC vers le NPV, le NDM et l'AHL sont immatures à la naissance et se développent principalement durant la deuxième semaine postnatale. L'hypothalamus est mûre à la troisième semaine postnatale (pour revue Bouret et al., 2004c).

1.3.1. Expression des neuropeptides hypothalamiques

Chacun des noyaux et aires hypothalamiques adultes se distinguent par son profil d'expression et ses populations neuronales. Néanmoins au cours de l'ontogenèse hypothalamique, un type neuronal peut provenir de différentes aires et une aire peut produire séquentiellement plusieurs types neuronaux. La formation des neurones peptidergiques débute durant le développement embryonnaire à E10,5. L'hypothalamus antérieur exprime *Pomc* à E11,5, puis *Trh*, *Ghrh* à E12,5, *Cart*, *Npy*, *Ghrh* à E13,5 et *Ot*, *Avp* et *Agrp* à E15,5. L'hypothalamus postérieur exprime *Trh* et *Ghrh* à E10,5, *Cart* à E11,5 puis *Crh*, *Avp*, *Npy* à E13,5 et *Ot* à E15,5. A E18,5, la formation des neurones peptidergiques est achevée (Díaz et al., 2015).

1.3.2. Neuritogenèse hypothalamique

La régulation de l'homéostasie énergétique implique de nombreuses connections synaptiques. La cinétique de formation de ces réseaux a été établie chez la souris à l'aide d'un marqueur fluorescent antérograde, le DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) qui a la particularité de diffuser le long de la membrane plasmique. A partir du sixième jour post-natal (P6), l'ARC émet des projections axonales dirigées vers le NDM. Ces projections s'achèvent à P12. Entre P8 et P10, les projections de l'ARC se dirigent vers le NPV et sont matures à P14. L'AHL reçoit des projections entre P10 et P12 qui s'achèvent à P16. L'ensemble de ce réseau hypothalamique est mûre à P18 (Bouret et al., 2004a, Bouret et al., 2004c).

1.3.3. Rôle neurotrophique de la leptine

En 1979, Bereiter et Jeanrenaud ont montré que la structure cérébrale des souris obèses *ob/ob* (déficientes en leptine) et *db/db* (déficientes pour le récepteur de la leptine) était différente de celle des souris contrôles. Les souris obèses présentaient une diminution de densité cellulaire et une altération de l'orientation dendritique notamment au niveau hypothalamique. En 1994, l'équipe de Friedman identifie le produit du gène *ob* comme étant la leptine (Zhang et al., 1994). Trois ans plus tard, Ahima et al. identifiaient un pic de leptine 5 à 10 fois supérieur entre P4 et P10 (Ahima et al., 1998). La corrélation temporelle entre ce pic de leptine et l'ontogenèse des réseaux hypothalamiques postnataux suggérait que la leptine possède un rôle neurotrophique (Ahima et al., 1998, Ahima et al., 1999, Vickers Mark et al., 2009) (figure 9).

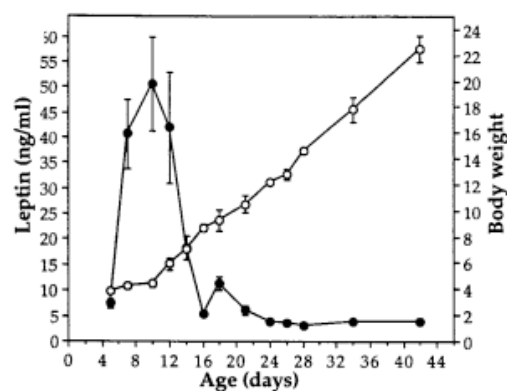


Figure 9 : Pic post-natal de leptine chez la souris

Un pic de leptine plasmatique est observé entre le huitième et le douzième jour post-natal. Le sevrage des animaux a lieu à P21. Tiré de : Ahima et al., 1998.

1.4. Leptine

La leptine est une hormone de la famille des adipokines sécrétée de manière proportionnelle à la masse de tissu adipeux. Elle reflète le statut énergétique à long terme de l'organisme et agit comme médiateur de la balance énergétique (Ahima et al., 2000, Allison et al., 2014). Au niveau hypothalamique elle agit principalement sur l'ARC, le NDM, le NVM et le noyau pré mammillaire ventral *via* ses récepteurs (Elmqvist et al., 1998). Elle exerce une action anorexigène en activant les neurones POMC/CART et inhibant les neurones NPY/AgRP (Elmqvist et al., 1998, Schwartz et al., 2000, pour revue Ahima et al., 2000, pour revue Majdic, 2009, Caron et al., 2010, Allison et al., 2014). La leptine agit également en stimulant les neurones OT, AVP et CRH du NPV et inhibant les neurones MCH de l'AHL induisant une diminution de la prise alimentaire et augmentation des dépenses énergétiques (Håkansson et al., 1998, pour revue Wynne et al., 2005).

1.4.1. Récepteurs et transport de la leptine

La leptine, hormone de 16kD ne diffuse pas librement au niveau du LCR, de l'EM et de la BHE (Schwartz et al., 1996, pour revue Ahima et al., 2000). Son transport se fait de manière active et nécessite la présence d'un transporteur qui est notamment présent dans le LCR.

La leptine possède six récepteurs, ObRa-ObRf, résultant de l'épissage alternatif de leur ARNm. Cinq agissent comme transporteurs membranaires (ObRa,b,c,d,f) et un comme transporteur plasmatique (ObRe). Le récepteur transmembranaire ObRb est nécessaire à la transduction du signal (Van Swieten et al., 2014) (figure 10) (Li et al., 2013, Ahima et al., 2000, Vickers Mark et al., 2009).

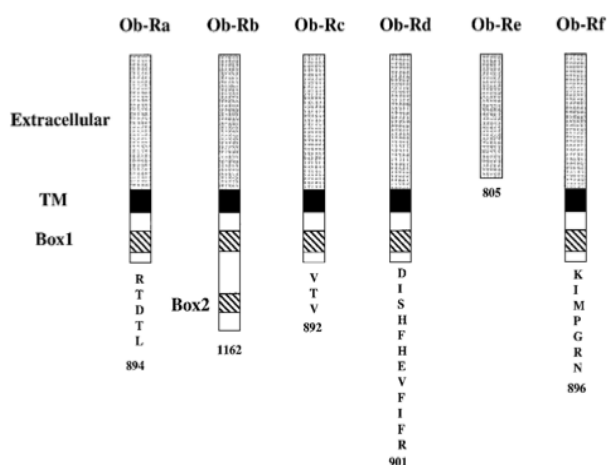


Figure 10 : Les différents isoformes du récepteur à la leptine

Les isoformes ObRa-ObRf possèdent un domaine extracellulaire commun mais diffèrent par leur domaine intracellulaire. ObRb est le seul à posséder un domaine intracellulaire permettant d'activer la cascade de signalisation de la leptine. ObRe ne possède pas de domaine transmembranaire. Le code alphabétique correspond aux acides aminés composant chacun des isoformes. TM : domaine transmembranaire, Tiré de la revue : Ahima et al., 2000.

1.4.2. Expression du récepteur ObRb

Au sein de l'hypothalamus, le récepteur ObRb est présent abondamment dans l'ARC où il est co-exprimé avec les neuropeptides NPY, AgRP, POMC et CART. On le retrouve également dans les NPV, NDM, NVM, l'AhL et le noyau pré-mammillaire ventral (Scott et al., 2009, Vickers Mark et al., 2009, Van Swieten et al., 2014). La délétion du récepteur à la leptine ObRb a été observée dans diverses populations neuronales et donne lieu à des altérations pondérales et métaboliques. Le KO ObRb, dans les neurones POMC/CART ou NPY/AgRP entraîne une hyperphagie et un surpoids chez la souris adulte. Dans tous les cas la perte de fonction simultanée d'ObRb dans les neurones POMC/CART et NPY/AgRP induit un surpoids plus important et une diminution des dépenses énergétiques (Van de Wall. et al., 2008). Le KO spécifique d'ObRb dans les neurones neurotensine de l'AhL conduit à une obésité, une augmentation modeste de la prise alimentaire et une diminution de l'activité locomotrice (Leininger et al., 2011, Van Swieten et al., 2014). Le KO spécifique d'ObRb dans les neurones SF-1 induit chez la souris un gain de poids important (Krieger et al., 1979, pour revue King, 2006, Kurrasch et al., 2007, Kim et al., 2011). La leptine est hormone anorexigène menant à une obésité lorsque qu'elle n'est pas fonctionnelle.

1.4.3. Leptino-resistance

La leptino-resistance est une conséquence de l'obésité. Les animaux obèses présentent un taux de leptine élevé qui n'entraîne pas de diminution de leur prise alimentaire et de leur poids corporel (Widdowson et al., 1997, Ottaway et al., 2015).

Deux mécanismes de résistances ont été identifiés. Le premier correspond à une diminution du transport de la leptine au niveau cérébral (Lin et al., 2000) et le deuxième à une diminution d'activation de la voie de signalisation de la leptine (pour revue Balland et Cowley, 2015). La leptino-resistance s'installe en trois étapes, (1) une augmentation de la masse de tissu adipeux et une sensibilité à la leptine attestée par une diminution de la prise alimentaire en réponse à une injection de leptine (2) une leptino-resistance périphérique identifiée par une injection ip de leptine mais une sensibilité centrale à la leptine attestée par une administration icv de leptine et (3) une leptino-resistance périphérique et centrale démontrée par une absence de réponse à la leptine injectée en icv et en ip (Lin et al., 2000).

L'EM est le premier site hypothalamique atteint par la leptine plasmatique. Cette dernière atteint ensuite l'hypothalamus medio-basal (HMB) via les tanycytes de l'EM. Chez les souris obèses, la leptine s'accumule dans l'EM et ne diffuse plus dans l'HMB. L'altération de la voie de signalisation de la leptine dans les tanycytes est responsable de cette absence de diffusion (Balland et al., 2014).

1.5. Insuline

L'insuline est une hormone anabolique produite par les cellules β -pancréatiques. Elle est sécrétée en réponse à une augmentation de glycémie qu'elle régule en supprimant la néoglucogenèse hépatique, la lipolyse et en promouvant la capture du glucose par les muscles squelettiques et le tissu adipeux (pour revue Könnner et Brüning, 2012, Inoue, 2015).

Son taux plasmatique augmente rapidement après un repas afin de diminuer la prise alimentaire en agissant au niveau central. Tout comme la leptine, l'insuline est corrélée à l'adiposité et possède un rôle anorexigène (Benoit et al., 2002, pour revue Plum et al., 2005). Une injection icv d'insuline induit une diminution d'expression de NPY dans l'ARC et une augmentation d'expression d' α -MSH (Schwartz et al., 1992), entraînant dans l'immédiat une diminution de la prise alimentaire et après quelques semaines une diminution du poids corporel (Ikeda et al., 1986). L'absence d'insuline provoque un diabète de type I permanent (Weiss et AL., 2015).

1.5.1. Récepteurs et transport de l'insuline

L'insuline plasmatique pénètre dans le SNC *via* la BHE. Son entrée se fait par un mécanisme de transport saturable impliquant son récepteur, IR (Baura et al., 1993, Sartorius et al., 2015). Il existe deux isoformes du récepteur à l'insuline, IR-A et IR-B, résultant d'un épissage alternatif. L'insuline a deux fois plus d'affinité pour IR-A. Cette affinité est dépendante du contexte membranaire dans lequel se trouvent ses récepteurs (Uhles et al., 2003).

1.5.2. Expression du récepteur IR

Au sein de l'hypothalamus, les récepteurs IR sont fortement exprimés dans l'ARC et plus modérément dans les NPV, NVM, NDM et l'AHL (Corp et al. 1986, pour revue Könnner et Brüning, 2012). Ils sont également exprimés dans les plexus choroïdes (Unger et al., 1989, Baura et al., 1993, pour revue Banks et al., 1997, pour revue Plum et al., 2005). La diminution d'expression de IR par un ARN interférence dans les neurones de l'ARC augmente les niveaux d'expression de NPY et AgRP et résulte en une hyperphagie chez le rat. Cette diminution d'expression provoque également une diminution de production de glucose hépatique (Obici et al., 2002) et une insulino-résistance hypothalamique et périphérique (Inoue et al., 2006). L'action de l'insuline au niveau central contrôle la production de glucose périphérique et affecte tout le métabolisme glucidique (pour revue Inoue, 2015).

1.5.3. Insulino-résistance

L'insulino-résistance est caractérisée par une diminution de capture du glucose et de la sensibilité à l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux malgré une stimulation de la synthèse d'insuline. L'insulino-résistance est associée à une obésité et un diabète de type II. L'insulino-résistance périphérique s'installe de manière progressive, elle est déclenchée par une augmentation d'adipocytes produisant des cytokines pro-inflammatoires. L'augmentation de cette inflammation altère la voie de signalisation de l'insuline dans le tissu adipeux, le foie et le muscle. Au stade pré-diabète, les cellules β -pancréatiques augmentent leur sécrétion d'insuline afin de maintenir une glycémie normale (pour revue Könnner et Brüning, 2012). Au stade diabète de type II, une hyperinsulinémie est d'abord observée puis une hyperplasie des cellules β -pancréatiques qui à terme ne produisent plus d'insuline (Escribano et al., 2009). Au niveau central, elle est la principale raison de développement d'une obésité. Cette insulino-résistance découle d'une diminution de l'activation de ses voies de signalisation due à une altération de son passage au travers de la BHE (Clegg et al., 2011).

De nombreuses études expérimentales ont montré que la leptinémie et l'insulinémie peuvent être modulées par une alimentation maternelle et impacter les homéostasies énergétique, glucidique et lipidique de la descendance (cf. chapitre II).

Chapitre II : PROGRAMMATION METABOLIQUE

Le concept de programmation métabolique repose sur les études épidémiologiques pionnières menées par David Barker à la fin des années 1980. Lors de ces études, il a observé une corrélation entre un faible poids de naissance et la prévalence de maladies cardiovasculaires, d'hypertension, d'accidents vasculaires cérébraux et d'un syndrome métabolique à l'âge adulte (Barker, 1995, Barker, 1999, pour revue Honson et Gluckman, 2014). Le syndrome métabolique est défini comme une association d'hypertension, de diabète de type II, d'hypertriglycéridémie et d'obésité. En 2004, ce concept a évolué en concept d'« origines fœtales de maladies acquises à l'âge adulte ». Ce concept postule une réponse adaptative immédiate du fœtus ou du nouveau-né soumis à un environnement périnatal et une réponse adaptative prédictive au cours de sa vie future (pour revue Honson et Gluckman, 2014). Par ailleurs, une différence entre les environnements pré et postnataux peut augmenter le risque de la descendance à développer des pathologies. Depuis une dizaine d'années, le concept d'« origines fœtales de maladies acquises à l'âge adulte » a évolué en DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease, origines développementales de la santé). Ce dernier rend compte de l'influence de l'environnement périnatal sur la physiologie et la physiopathologie de la descendance (Armitage et al., 2004, Williams et al., 2014).

2.1. Programmation métabolique par des régimes hyperlipidiques

Aujourd'hui, l'obésité touche particulièrement les pays occidentaux tout comme les pays en voie de développement. Les régimes alimentaires actuels qui sont de plus en plus appétants et riches en lipides et carbohydrates sont incriminés. L'enjeu est donc d'évaluer leur impact et les éventuels mécanismes de cette obésité. Depuis une dizaine d'années, des études expérimentales sur des modèles animaux consistant à nourrir des mères avec un régime hyperlipidique (régime HF) ont été développées et leur impact sur la descendance étudié.

Quels sont les environnements périnataux hyperlipidiques responsables de désordres métaboliques à terme ? Comment la durée des régimes maternels, la qualité et la quantité des lipides influencent-elles la programmation métabolique ? Pour répondre à ces questions, diverses études expérimentales ont été menées. Ces études diffèrent par la période couverte

par le régime qui peut être initié avant l'accouplement (régime pré-gestationnel), le jour de la conception (régime gestationnel ou restreint à la gestation) ou à la naissance (régime restreint à la lactation). Ces régimes diffèrent également par les quantités de lipides qui peuvent varier pour les régimes HF de 20 à 74%, pour les régimes contrôles de 5 à 25% et par la qualité des lipides qui peuvent être d'origine animale ou végétale.

Dans ce chapitre, je prendrai une étude-type représentative de la majorité des résultats publiés. Je citerai également les études donnant des résultats discordants. J'ai choisi de différencier les régimes selon leur durée (pré-gestationnel, gestationnel, restreint à la gestation, restreint à la lactation). Pour chacune de ces quatre durées, je présenterai sous forme de tableaux l'effet direct des régimes HF sur les mères et la réponse adaptative immédiate induite par ces régimes chez la descendance puis la réponse adaptative prédictive. Dans un deuxième temps, je décrirai les conséquences de ces régimes sur l'inflammation au niveau central, l'ontogenèse hypothalamique et enfin les modifications épigénétiques de différents tissus. Par convention, les femelles, mères et descendances seront désignées selon le régime maternel : C ou HF.

2.1.1. Régimes hyperlipidiques pré-gestationnels

Les modèles expérimentaux établis depuis 10 ans et toujours pratiqués utilisent des femelles rat ou souris nourries avec différents régimes HF entre 1 et 23 semaines avant l'accouplement et durant les périodes de gestation et lactation (figure 11).

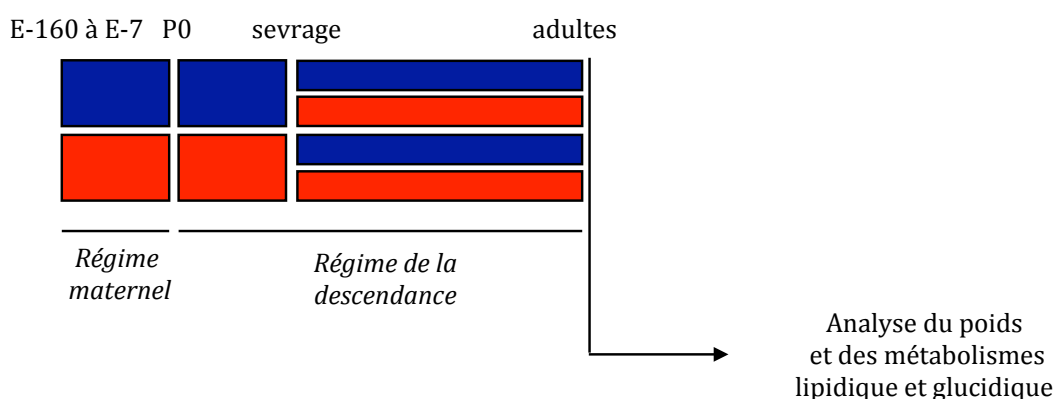


Figure 11 : Régime hyperlipidique pré-gestationnel - Schéma expérimental

Des femelles rat ou souris sont nourries avec un régime *contrôle* (C, ■) ou un régime *hyperlipidique* (HF, ■) 1 à 14 semaines avant accouplement et durant les périodes de gestation et lactation. Leurs descendances sont sevrées au régime C ou HF. Durant la période post-natale précoce, la période juvénile ainsi qu'à l'âge adulte, les métabolismes lipidiques, glucidiques sont étudiés.

L'idée sous jacente à ces études était que plus la durée du régime avant la conception était longue, plus les désordres causés chez la descendance seraient importants. Les travaux du laboratoire de Patel constituent un paradigme d'étude de l'impact d'un long régime HF démarré avant la gestation sur les homéostasies énergétique et glucidique chez le rat adulte (Srinivasan et al., 2006 Gupta et al., 2009, Stachowiak et al., 2013). La programmation métabolique résulte d'interactions entre différents paramètres qui regroupent l'environnement périnatal, l'environnement adulte et l'âge (cf. discussion) qui seront détaillé précisément dans les tableaux.

De jeunes femelles de 3 semaines ont été nourries avec un régime HF (60%, 16%, 24% de l'apport calorique proviennent respectivement des lipides, protéines et carbohydrates) ou un régime C (11%, 19%, 70% de l'apport calorique proviennent respectivement des lipides, protéines et carbohydrates) 14 semaines avant l'accouplement (table 1, étude 1).

Quel est l'impact des altérations physiologiques de la mère sur la réponse adaptative immédiate de la descendance ? Les altérations du métabolisme de la descendance induites par des régimes maternels HF sont représentées dans la table 1. Les descendances ont été sevrées entre P21 et P24 sous régime C et analysées pour leur réponse adaptative prédictive (Table 2).

Les désordres survenus chez la descendance attestent une perturbation durable des homéostasies énergétique et glucidique par ce régime maternel.

Etude	Période pré-gestationnelle couverte par le régime HF	Composition régime HF	Composition régime C	Effet sur les mères en fin de gestation	Effet sur l'homéostasie énergétique de la descendance	Effet sur l'homéostasie glucidique de la descendance	Effet sur l'homéostasie lipidique de la descendance	Différences d'expression en ARNm chez la descendance	Références bibliographiques
1	14 sem	60%L, 16%P, 24%C	11%L, 19%P, 70%C	↑PC (+20%) ↑Ins (+80%) ↓Gly (+34%) ↑TG (+68%)	À la N : PC =	À la N : ↑Ins (+62%) ↑insuline dans le pancréas (+43%)	À la N : ↑Lep (+78%)	À la N : ↑ObRb (+260%) ↑STAT3 (+70%) ↑IR (+120%) ↑NPY (+80%) ↑AgRP (+80%) ↑POMC (+240%) ↑TMC4R (+210%)	Srinivasan et al., 2006 Gupta et al., 2009 Stachowiak et al., 2013
2	8 sem	9%L, 22%P, 68%C	29%L, 17%P, 54%C		À la N : PC = À P21 : ↑PC (+53%)	À P21 : ↑Gly (+30%)	À P21 : ↑Lep (+62%)	À P21 : ↓PSTAT3 (-40%) ↓SOCS3 (-56%)	Franco et al., 2012
3	5 sem	14%L, 21%P, 65%C	34%L, 18%P, 50%C		À la N : PC = À P1 : ↑PC (+10%)			À P1 : ↓AgRP (-20%) ↑POMC (+150%) dans l'ARC	Chen et Morris, 2009
4	4 sem	10%L, 20%P, 70%C	60%L, 20%P, 20%C		À la N : PC = À P7 : PC		À P7 : masse grasse Lep		White et al., 2009
12	4 sem 12 sem 23 sem	10%L, 20%P, 70%C	60%L, 20%P, 20%C	↑PC (+5 à +80%)	À la N : PC =		À la N : ↓TG (-100 à -150%)	À la N : ↓IL1b (-50%) ↓IL6 (-30%)	Krasnow et al., 2011
13	6 sem	11%L, 23%P, 66%C	64%L, 13%P, 23%C	À la N : ↓PC (-4%) À P21 : ↓PC (-32%)	À la N : ↓PC (-10%)			À la N : ↑IL10 (+230%) ↑IL1b (+158%)	Couvreux et al., 2011
14	4 sem	12%L, 28%P, 60%C	62%L, 18%P, 20%C	À P1 : ↑PC					Masuyama et al., 2014
15	1 sem	31%L, 15%P, 54%C	13%L, 18%P, 69%C	À P3 : PC = À P11 : ↓PC (-20% à -38%) À P21 : ↓PC (-48% à -54%)					Kozak et al., 2000

Table 1: impact de régimes maternels hyperlipidiques pré-gestationnels sur la réponse adaptative immédiate de la descendance

Sem : semaine
 L : lipides
 P : protéines
 C : carbohydrates
 N : naissance
 P1 : 1 jours après la naissance

↑ : augmentation
 ↓ : diminution
 PC : poids corporel
 Gly : glycémie
 Ins : insulinémie
 TG : triglycéridémie

Lep : leptinémie

Etude	Période pré-gestationnelle couverte par le régime HF	Composition régime HF	Composition régime C	Effet sur les mères en fin de gestation	effet sur l'homéostasie énergétique de la descendance	Effet sur l'homéostasie glucidique de la descendance	Effet sur l'homéostasie lipidique de la descendance	Différences d'expression en ARNm chez la descendance	Références bibliographiques
1	14 sem	60%L, 16%P, 24%C	11%L, 19%P, 70%C	↑PC (+20%) ↑Ins (+80%) ↑Gly (+34%) ↑TG (+68%)	P30 à P120 : ↓PC	À P40 : ↑Ins (+75%) À P90 : ↑Ins (+70%) À P120 : ↑Ins (+74%) ↑Gly (+9%)	À P120 : ↑AGL(+30%) ↑TG (+37%)		Srinivasan et al., 2006, Gupta et al., 2009, Stachowiak et al., 2013
5	6 sem	14%L, 21%P, 65%C	43%L, ?%P, ?%C					À P60 : ↓NPY (-12%) dans l'ARC	Chen et al., 2014
6	6 sem	11%L, 23%P, 66%C	64%L, 13%P, 23%C		À P90 : ↓PC (-17%)		À P90 : ↓Lep(-16%)		Couvreur et al., 2011
7	5 sem	14%L, 21%P, 65%C	34%L, 18%P, 50%C					À P135 : ↑CRH (+10%) ↑Y1 (+200%) ↑MC4R (+50%) dans le NPV	Chen et al., 2009
8	4 sem	12%L, 23%P, 65%C	59%L, 21%P, 20%C					À P90 : ↑IR (+40%)	Buckley et al., 2005
9	2 sem	9%L, 22%P, 68%C	29%L, 17%P, 54%C	PC =			À P270 : ↑TG (+37%)	À P270 : ↓Ppargc1a (-50%) ↓IR (-40%)	Burgueno et al., 2013
10	1 sem	4%L, 22%P, 51%C	30%L, 18%P, 40%C			À P180 : ↑ nombre de cellule β-pancréatiques (+26%) ↓ contenu en insuline (-53%)			Taylor et al., 2004
11	1 sem	31%L, 15%P, 54%C	13%L, 18%P, 69%C		À P180 : ↓PC (-12% à -16%)				Kozak et al., 2000

Table 2: impact de régimes maternels hyperlipidique pré-gestationnels sur la réponse adaptative prédictive de la descendance

Sem : semaine

L : lipides

P : protéines

C : carbohydrates

N : naissance

P30 : 30 jours après la naissance

↑ : augmentation

↓ : diminution

PC : poids corporel

Gly : glycémie

Ins : insulémie

TG : triglycéridémie

Lep : leptinémie

AGL : acides gras libres

Concernant le phénotype maternel durant la gestation, l'équipe de Chen et trois autres équipes présentent des résultats similaires (Chen et al., 2008, Mitra et al., 2008, Chen et al., 2009, Morris et Chen, 2009, White et al., 2009, Masuyama et Hiramatsu, 2014). Les régimes HF pré-gestationnels n'induisent un surpoids et une altération des métabolismes glucidique et lipidique chez les femelles qu'au delà de deux semaines (Koukkou et al., 1998, Ghebremeskel et al., 1999, Kozak et al., 2000, Khan et al., 2003, Khan et al., 2004, Taylor et al., 2004, Buckley et al., 2005, Khan et al., 2005, Armitage et al., 2005, Chen et al., 2008, Mitra et al., 2008, Chen et Morris, 2009, Morris et Chen, 2009, Chen et al., 2009, Jones et al., 2009, White et al., 2009, Krasnow et al., 2011, Franco et al., 2012, Burgueño et al., 2013, Chen et al., 2014, Kang et al., 2014, Masuyama et Hiramatsu, 2014, Sanders et al., 2014).

Concernant le métabolisme des descendances à la naissance, deux autres études présentent des résultats similaires aux études 1 concernant le poids de naissance (White et al., 2009, Franco et al., 2012). Ces études présentent en plus des données durant la période post-natale précoce (Table 1, études 2 et 4).

A la fin de la lactation, le lait maternel montre une teneur plus élevée en protéines (+18%, $p < 0,05$), cholestérol (+52%, $p < 0,05$) et triglycérides (+86%, $p < 0,05$) sans modification de sa leptinémie (Franco et al., 2012).

La composition du lait maternel peut être une cause du surpoids et des altérations métaboliques observés durant la lactation.

Concernant le métabolisme des descendances adultes, quatre études montrent des caractéristiques similaires aux études 1 (Taylor et al., 2004, Buckley et al., 2005, Chen et al., 2009, Burgueño et al., 2013, Chen et Morris., 2014). Ces études ont en plus observé une altération hépatique, musculaire, pancréatique et hypothalamique (Table 2, études 5 à 10).

L'équipe de Krasnow a étudié l'impact d'un régime HF donné 4, 12 et 23 semaines avant l'accouplement sur les descendances à la naissance montrant des résultats similaires et discordants aux études précédentes. J'utiliserai la terminologie suivante pour désigner les mères et les descendances ; HF/4, HF/12 et HF/23 (Table 1, étude 12).

Ce régime HF donné durant 23 semaines induit un retard de croissance intra-utérine et une inflammation.

Deux études montrent des résultats discordants concernant la descendance avant le sevrage (table 1, études 13, 14 et 15) (Chen et Morris, 2009, Masuyama et Hiramatsu, 2014). Deux autres études montrent des résultats discordants concernant la descendance adulte (table 2, études 6 et 11) (Kozak et al., 2000, Couvreur et al., 2011). Ces régimes diffèrent des autres régimes par l'origine végétale de leurs lipides, ce qui peut être la cause du déficit de poids de la descendance.

L'ensemble de ces résultats montre qu'un régime maternel HF pré-gestationnel induit une réponse prédictive immédiate et une réponse prédictive adaptative chez la descendance qui se manifestent par des modifications de leurs homéostasies énergétique, lipidique et glucidique (cf. discussion).

2.1.1.1. Programmation métabolique sous régime hyperlipidique au sevrage

L'équipe de Chen a cherché à étudier l'impact d'un régime maternel HF sur la descendance sevrée au régime HF chez le rat. J'utiliserai la terminologie suivante pour désigner la descendance : descendance CC, CHF, HFC et HFHF, le premier régime correspond au régime périnatal et le deuxième au régime du sevrage. Je comparerai la descendance HFHF à la descendance CHF et la descendance HFC à la descendance CC (table 3).

L'ensemble de ces résultats reflète d'une part, une altération des homéostasies glucidique et lipidique de la descendance HF et d'autre part une exacerbation de l'altération de ces homéostasies lorsque cette dernière se trouve dans un environnement hyperlipidique.

Etude	Période pré-gestationnelle couverte par le régime HF	Composition régime HF	Composition régime C	Effet sur l'homéostasie énergétique de la descendance	Effet sur l'homéostasie glucidique de la descendance	Effet sur l'homéostasie lipidique de la descendance	Différences d'expression en ARNm chez la descendance	Références bibliographiques
5 et 7	5-6 sem	14%L, 21%P, 65%C	43%L, 29%P, 28%C	<p>À P75 : HFHF : ↑PC (+20%) HFC : ↑PC (+10%)</p>	<p>À P75 : HFHF : intolérance au glucose Ins (+53%) HFC : intolérance au glucose</p>	<p>À P75 : HFHF : ↑masse adipeuse (+25% à +70%) TG (+150%) Lep (+998%) HFC : ↑masse adipeuse (+3% à +40%)</p>	<p>À P75 : HFHF : ↓AgRP (-60%) ↓POMC (-38%) dans l'ARC ↑CRH (+120%) ↑MC4R (+40%) dans le PVN HFC : ↓AgRP (-30%) ↓POMC (-30%) dans l'ARC ↓CRH (-60%) ↓MC4R (-25%) dans le PVN</p>	Chen et al., 2014 Chen et al., 2009

Table 3 : impact d'un régime maternel HF pré-gestationnel sur le métabolisme de la descendance sevrée au régime hyperlipidique

Sem : semaine

L : lipides

P : protéines

C : carbohydrates

N : naissance

P75 : 75 jours après la naissance

↑ : augmentation

↓ : diminution

PC : poids corporel

Gly : glycémie

Ins : insulinémie

TG : triglycéridémie

Lep : leptinémie

2.1.1.2. Programmation métabolique sous régime hyperlipidique à long terme

Plusieurs études se sont penchées sur l'analyse de la programmation d'un régime maternel HF à long terme, lorsque la descendance est tout d'abord sevrée sous régime C puis transférée sous régime HF. Tout comme précédemment, je comparerai la descendance HFHF à la descendance CHF et la descendance HFC à la descendance CC (Table 4, étude 4).

L'étude réalisée par White et al., a consisté à nourrir la descendance avec un régime HF à partir de 2 mois et ce durant 10 semaines. A 2 mois, la descendance HF montrait déjà un poids corporel supérieur (+10%, $p < 0,05$) à la descendance C. A l'issue des 10 semaines de régime, la descendance HF semble adapter son taux de neuropeptides lorsqu'elle est nourrie avec un régime HF.

Une étude similaire a été réalisée à plus long terme. La descendance sevrée sous régime C a été nourrie avec un régime HF (29% lipides) à partir de 4 mois et ce durant 18 semaines (Table 4, étude 9) (Burgueño et al., 2013).

La programmation métabolique est active à 5 et 9 mois. Un régime HF donné à court ou long terme provoque une exacerbation de l'altération des homéostasies énergétiques, lipidique et glucidique chez la descendance issue d'un environnement périnatal inapproprié.

Etude	Période pré-gestationnelle couverte par le régime HF	Composition régime HF	Composition régime C	effet sur l'homéostasie énergétique de la descendance	Effet sur l'homéostasie lipidique de la descendance	Différences d'expression en ARNm chez la descendance	Références bibliographiques
9	2 sem	9%L, 22%P, 68%C	29%L, 17%P, 54%C		à P270 : HFHF : ↑ masse grasse (+114%) ↑ Lep (+62%)		Burgueno et al., 2013
4	4 sem	10%L, 20%P, 70%C	60%L, 20%P, 20%C	à P150 : HFHF : ↑ PC		à P150 : HFHF : NPY = AgRP = POMC = dans l'ARC HFC : NPY = AgRP = POMC = dans l'ARC CHF : ↑ NPY (+31%) dans l'ARC	White et al., 2009

Table 4 : impact de régimes maternels hyperlipidiques pré-gestationnels sur le métabolisme de la descendance adulte

Sem : semaine
L : lipides
P : protéines
C : carbohydrates
N : naissance

P150 : 150 jours après la naissance
↑ : augmentation
↓ : diminution
PC: poids corporel
Lep : hyperleptinémie

Ins : insulinémie
Gly : glycémie
TG : triglycéridémie

2.1.2. Régimes hyperlipidiques gestationnels

A l'inverse des régimes pré-gestationnels, les régimes gestationnels n'induisent aucune modification du poids corporel ou des métabolismes lipidique et glucidique des mères rat et souris (Cerf et al., 2006, Chang et al., 2008, Parente et al., 2008, Gregorio et al., 2010, Purcell et al., 2011, Cerf et al., 2012, Sanchez et al., 2012, Volpato et al., 2012).

L'équipe de Chang a étudié chez le rat, l'impact d'un régime HF donné durant les périodes de gestation et lactation sur le métabolisme de la descendance de la naissance au stade juvénile.

La descendance a d'abord été analysée de la naissance au sevrage à P21 (table 5, étude 16) puis les jeunes adultes HF ont été analysés à P70 (Table 6, étude 16) (Chang et al., 2008).

Concernant le métabolisme de la descendance, trois autres études montrent des résultats similaires avec des données en plus au sevrage (table 5 étude 17) (Cerf et al., 2006) et à l'âge adulte (table 6 étude 20) (Volpato et al., 2012).

Le régime maternel gestationnel occasionne tout comme le régime pré-gestationnel des altérations de l'homéostasie énergétique ainsi que des métabolismes lipidique et glucidique chez la descendance.

Cependant, concernant la croissance post-natale de la descendance HF, deux études réalisées chez le rat montrent des résultats discordants (tables 5 et 6, études 18 et 19) (Parente et al., 2008, Sanchez et al., 2012). L'équipe de Sanchez analyse trois régimes HF de qualité lipidique différente, un premier à base d'huile d'olive (HO), un deuxième à base de beurre (B) et un troisième à base de margarine (M).

Ces résultats démontrent que la qualité des lipides induit une réponse adaptative immédiate chez la descendance sans induire de réponse adaptative prédictive (cf. discussion).

Etude	Composition régime HF	Composition régime C	Effet sur les mères en fin de gestation	Effet sur l'homéostasie énergétique de la descendance	Effet sur l'homéostasie glucidique de la descendance	Effet sur l'homéostasie lipidique de la descendance	Différences d'expression en ARNm chez la descendance	neurogenèse hypothalamique chez la descendance	Références bibliographiques
16	50%L, 7%P, 7%C	25%L, 7%P, 7%C	PC =	N au sevrage: PC =	À P15 : ↑ Gly (+83%) ↑ Ins (+46%)	À P15 : ↑ TG (+25%)	À P15 : ↑ ORX (+75%) ↑ MCH (+75%) dans l'AHL ↑ galanine (+100%) ↑ dynorphine (+40%) ↑ enképhaline (+75%) dans le NPV	À P0 : ↑ Densité des neurones : enképhaline (+155%) galanine (+1000%) dynorphine(+120%) dans le NPV ↑ ORX (+158%) ↑ MCH (+68%) dans l'AHL À P8 : ↑ neurogenèse dans le NPV et l'AHL	Chang et al., 2008
17	40%L, 14%P, 46%C	10%L, 15%P, 75%C		À P21 : ↑ PC (+27%)	À P21 : ↑ Ins (-41%)				Cerf et al., 2006
18	30%L, 15%P, 55%C	6%L, 23%P, 71%C	À la N : ↑ PC (+18%) À P21 : ↑ PC (+25%)						Parente et al., 2008
19	49%L, 19%P, 32%C	17%L, 19%P, 64%C	À la N : HF/HO : ↓ PC (-5%) À P12 : HF/M et HF/B : ↑ PC (-5%) À P21 : HF/HO : ↓ PC (-14%) À P120 : HF/M vs HF/B : ↓ PC (-6%)			À P21 : HF/HO : ↓ Lep (-19%) HF/B : ↑ Lep (+33%)	À P21 : HF/HO : ↓ ObRb (-20%) dans l'ARC	À P21 : HF/B : ↑ nombre de cellules NPY (+20%)	Sanchez et al., 2012

Table 5 : impact de régimes maternels hyperlipidiques gestationnels sur la réponse adaptative immédiate de la descendance

Sem : semaine
L : lipides
P : protéines
C : carbohydrates
N : naissance

P21 : 21 jours après la naissance
↑ : augmentation
↓ : diminution
PC: poids coporel
Lep : hyperleptinémie

Ins : insuliniémie
Gly : glycémie
TG : triglycéridémie

Étude	Composition régime HF	Composition régime C	Effet sur l'homéostasie énergétique de la descendance	Effet sur l'homéostasie glucidique de la descendance	Effet sur l'homéostasie lipidique de la descendance	Références bibliographiques
16	50%L, 7%P, ?%C	25% L, 7%P, ?%C	À P70 : ↑ PC (+18%) ↑ PA (+22%) appétence pour le gras		À P70 : ↑ TG (+75%) ↑ Lep (+122%)	Chang et al., 2008
19	49%L, 19%P, 32%C	17% L, 19%P, 64%C	À P180 : PC =			Sanchez et al., 2012
20	49%L, 19%P, 32%C	17% L, 19%P, 64%C		À P90 : ↑ Ins (+216%) insulino-resistance	À P90 : ↑ masse grasse ↑ Lep (+82%)	Volpato et al., 2012
21	49%L, 19%P, 32%C	17% L, 19%P, 64%C	À P120 : HF/M vs HF/B : ↓ PC (-6%) À P180 : PC =			Sanchez et al., 2012

Table 6 : impact de régimes maternels hyperlipidiques gestationnels sur la réponse adaptative prédictive de la descendance

Sem : semaine
L : lipides
P : protéines
C : carbohydrates
N : naissance

P70 : 70 jours après la naissance
↑ : augmentation
↓ : diminution
PC: poids corporel
PA : prise alimentaire

Lep : hyperleptinémie
Ins : insulinémie
Gly : glycémie
TG : triglycéridémie

2.1.2.1. Programmation métabolique sous régime HF

Comme dans le cas d'un régime pré-gestationnel, un régime gestationnel induit chez la descendance juvénile et adulte une exacerbation des désordres métaboliques lorsqu'ils sont sous régime HF.

Quatre équipes réalisent une étude, chez le rat ou la souris, relative à l'impact d'un régime gestationnel sur la réponse prédictive immédiate de la descendance. Pour ce faire la descendance est nourrie avec un régime HF du sevrage à l'âge adulte (table 7 études 17, 18, 20 et 22) (Cerf et al., 2012, Parente et al., 2008, Gregorio et al. 2010, Volpato et al., 2012).

Etude	Composition régime HF	Composition régime C	Effet sur l'homéostasie énergétique de la descendance	Effet sur l'homéostasie glucidique de la descendance	Effet sur l'homéostasie lipidique de la descendance	Références bibliographiques
17, 18 et 22	40%L, 14%P, 46%C 30%L, 15%P, 55%C 17%L, 19%P, 64%C	10% L, 15%P, 75%C 6% L, 23%P, 71%C 49%L, 19%P, 32%C	À P30 : CHF : ↑ PC HFC : ↑ PC HFHF : ↑ PC			Cerf et al., 2012, Parente et al., 2008, Gregorio et al., 2010
20	49%L, 19%P, 32%C	17% L, 19%P, 64%C	À P90 : CHF : ↑ PC (+22%) HFC : ↑ PC (+10%) HFHF : ↑ PC (+16%)	À P90 : CHF : ↑HOMA-IR (+220%) HFC : ↑HOMA-IR (+216%) HFHF : Ins ↑HOMA-IR (+230%) intolérance au glucose	À P90 : CHF : ↑Lep (+131%) HFC : ↑Lep (+156%) HFHF : ↑ masse grasse rétropéritonéale, épидидymale et inguinale ↑Lep (+156%)	Volpato et al., 2012
21	49%L, 19%P, 32%C	17% L, 19%P, 64%C	À P180 : HF/HO : ↑ PC (+10%)		À P180 : HF/HO : ↑masse grasse (+35%) ↑Lep (+30%) HF/B : ↑Masse grasse (+53%) ↑Lep (+75%) HF/M vs HF/B : ↑masse grasse (-23%)	Sanchez et al., 2012

Table 7 : impact de régimes maternels hyperlipidiques gestationnels sur le métabolisme de la descendance adulte sous régime hyperlipidique

Sem : semaine
L : lipides
P : protéines
C : carbohydrates
N : naissance

P30 : 30 jours après la naissance
↑ : augmentation
↓ : diminution
PC: poids corporel
Lep : hyperleptinémie

Ins : insulinémie
Gly : glycémie
TG : triglycéridémie

L'étude de Sanchez portant sur la qualité des lipides au cours de la période post-natale précoce a également porté sur la réponse prédictive adaptative de la descendance adulte sous régime HF. Les trois descendance HF/HO, HF/B et HF/M sont nourries avec un régime HF de 4 à 6 mois. Le régime HF à base de margarine semble être le moins néfaste alors que celui à base d'huile d'olive semble engendrer le plus de désordres métaboliques.

Un régime HF gestationnel suffit à induire une réponse adaptative immédiate et une réponse adaptative prédictive qui pour cette dernière est exacerbée lorsque la descendance se trouve dans un environnement adulte inapproprié.

2.1.3. Régimes hyperlipidiques restreints à la gestation

Cerf a réalisé une étude chez le rat au cours de laquelle il recherche la période critique de gestation induisant une mal-programmation de la descendance. Un régime HF a été donné durant la première semaine de gestation (HF1), la deuxième semaine de gestation (HF2), la troisième semaine de gestation (HF3) ou durant les 3 semaines de gestation (HF1-3) (table 8, étude 23) (Cerf et al., 2005).

Deux autres études corroborent ces résultats et donnent des résultats supplémentaires chez la descendance adulte (table 8, études 16 et 22) (Chang et al., 2008, Gregorio et al., 2010).

Un régime donné durant la période de gestation induit une programmation métabolique chez la descendance. Une seule semaine suffit à induire un effet, cependant les désordres métaboliques sont plus importants lorsque le régime couvre toute la période de gestation.

Etude	Composition régime HF	Composition régime C	Effet sur les mères en fin de gestation	Effet sur l'homéostasie énergétique de la descendance	Effet sur l'homéostasie glucidique de la descendance	Effet sur l'homéostasie lipidique de la descendance	Références bibliographiques
23 et 24	40%L, 14P, 46%C	10%L, 15%P, 74%C	HF1 : ↑ Gly (+4%) HF2 : ↑ TG (+5%) HF3 : ↑ TG (+17%) HF1-3 : ↑ TG (+14%) ↑ PC (+10%)	À la N : HF1 : ↑ PC (-20%) HF2, HF3, HF1-3 : PC = À P21 : HF1-3 : ↓ PC (-40%)	À la N : HF1 : ↓ Gly (-40%) HF2 : ↓ Gly (-30%) HF1-3 : ↑ Gly (+40%) ↓ volume des cellules β-pancréatiques (-20%) HF1, HF3 et HF1-3 : ↓ nombre de cellules β-pancréatiques (-18%) À P21 : HF1-3 : ↓ Ins (-500%)		Cerf et al., 2005, Cerf et al., 2009
16 et 22	50%L, 7%P, 7%C 17%L, 19%P, 64%C	25%L, 7%P, 7%C 49%L, 19%P, 32%C		À P75 : ↑ PC (+18%)	À P75 : ↑ Ins (+60%) intolérance au glucose et insulino-résistance	À P75 : ↑ TG (+75%) ↑ Lep (+150%)	Chang et al., 2008, Gregorio et al., 2010

Table 8: impact de régimes maternels hyperlipidiques restreints à la gestation sur les réponses adaptatives immédiate et prédictive de la descendance

Sem : semaine
 L : lipides
 P : protéines
 C : carbohydrates
 N : naissance

P21 : 21 jours après la naissance
 ↑ : augmentation
 ↓ : diminution
 PC : poids corporel
 Lep : hyperleptinémie

Ins : insuliniémie
 Gly : glycémie
 TG : triglycéridémie

2.1.4. Régimes hyperlipidiques restreints à la lactation

L'Equipe de Vogt a étudié l'effet d'un régime maternel HF restreint à la période de lactation chez la souris et a montré de nombreux désordres métaboliques chez la descendance juvénile et adulte (table 9, étude 25) (Vogt et al., 2014).

Afin de déterminer les causes centrales des désordres métaboliques de la descendance, Vogt et al. ont étudié l'expression des neuropeptides orexigènes et anorexigènes dans l'ARC et le NPV ainsi que la densité des projections neuronales de l'ARC vers les noyaux impliqués dans l'homéostasie énergétique.

La délétion spécifique de IR dans les neurones POMC a montré que l'hyperinsulinémie post-natale est responsable de la diminution des projections neuronales α -MSH vers le PVN postérieur. Celle-ci est à son tour responsable d'une diminution de l'innervation des cellules β -pancréatiques et de la stimulation de sécrétion d'insuline par le glucose (table 9, étude 25) (Vogt et al., 2014) (figure 12).

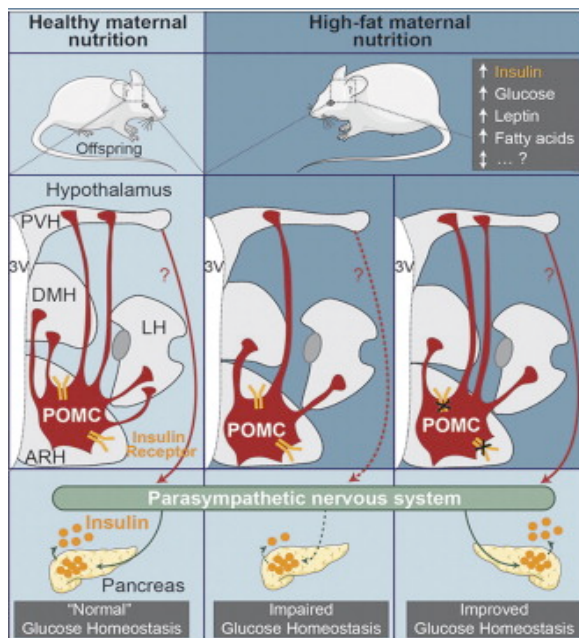


Figure 12 : impact d'un régime maternel HF sur les projections axonales de la descendance

Le régime maternel HF restreint à la lactation diminue les projections axonales des neurones POMC et NPY/AgRP de l'ARC vers les NPV, NDM et l'AhL. Ces altérations ont des répercussions sur le métabolisme glucidique de la descendance. Tiré de Vogt et al., 2014

Lorsque le régime est restreint à la lactation, le lait maternel a une composition différente de celle d'un régime pré-gestationnel. Le lait maternel de ces souris contient une concentration plus importante en glucose (+50%, $p < 0,01$) ainsi qu'une augmentation des taux de leptine (3,7 fois, $p < 0,05$) et d'insuline (+60%, $p < 0,05$) provoquant chez les descendances au sevrage une hyperinsulinémie et à 4 mois, un surpoids accompagné de désordres métaboliques (Vogt et al., 2014, cf. paragraphes 1.6.4 et 1.7).

Concernant le poids de la descendance au sevrage, deux autres études menées chez le rat montrent des résultats similaires (Cerf et al., 2005, Giriko et al., 2013).

Etude	Composition régime HF	Composition régime C	Effet sur l'homéostasie énergétique de la descendance	Effet sur l'homéostasie glucidique de la descendance	Effet sur l'homéostasie lipidique de la descendance	Différences d'expression en ARNm chez la descendance	Références bibliographiques
25	12%L, %P, %C	55%L, %P, %C	À P21 : PC =	À P21 : ↑ Ins (+160%)		À P21 : ↓ TRH (-70%) dans le NPV ↓ projections des fibres AgRP+ et α-MSH+ (-25%) vers le NPV ant (-60%) vers le NPV post (-70%) vers le NDM (-60%) vers l' AHL	Vogt et al., 2014
26	40%L, 14P, 46%C	10%L, 15%P, 74%C	À P21 : PC =	À P21 : ↑ TG (+200%)			Cerf et al., 2008
25	12%L, %P, %C	55%L, %P, %C	À partir de P60 : ↑ PC (10% à 30%)	À partir de P60 : insulino-résistance et intolérance au glucose	À partir de P60 : ↑ Lep (+130%) ↑ masse grasse (+20%)	À P60 : ↓ TRH (-30%) dans le PVN ↓ projections des fibres AgRP+ et α-MSH+ (-30%) vers le NPV ant (-40%) vers le NPV post (-45%) vers le NDM (-40%) vers l' AHL	Vogt et al., 2014

Table 9 : impact de régimes maternels hyperlipidiques restreints à la lactation sur les réponses adaptative immédiate et prédictive de la descendance

Sem : semaine
L : lipides
P : protéines
C : carbohydrates
N : naissance

P21 : 21 jours après la naissance
↑ : augmentation
↓ : diminution
PC : poids corporel
Lep : hyperleptinémie

Ins : insulinémie
Gly : glycémie
TG : triglycéridémie

L'exposition à un régime HF durant la lactation suffit à induire des désordres métaboliques chez la descendance. Ces désordres se manifestent par une altération de la formation des réseaux neuronaux de l'ARC.

2.2. Régimes maternels hyperlipidiques et développement hypothalamique

La neurogenèse hypothalamique a lieu durant la période embryonnaire tandis que les projections neuronales de l'ARC se mettent en place durant les deuxièmes et troisièmes semaines post-natales, période au cours de laquelle a lieu le pic de leptine responsable de la neuritogenèse hypothalamique (cf. paragraphe 1.3).

Certains régimes maternels HF ont un impact sur la leptinémie de la descendance. Un régime HF pré-gestationnel chez le rat modifie le pic post-natal de leptine. Ce dernier est amplifié et prolongé. Ces descendances ont un taux de leptine plus élevé durant la deuxième moitié de la lactation contrairement aux descendances C qui montrent deux pics de leptine, un à P8 et un deuxième plus léger à P14 (Kirk et al., 2009).

Un régime HF pré-gestationnel chez la souris affecte la densité des projections de l'ARC vers le NPV, le NDM et l'AHN (Vogt et al., 2014). A la naissance, 50% des projections des neurones NPY de l'ARC allant vers le NPV sont diminuées chez la descendance HF (Sanders et al., 2014). Cette diminution de projections est due à une altération de formation des axones à l'état embryonnaire qui peuvent mener à terme à des altérations des métabolismes glucidique et lipidique (Vogt et al., 2014). Par ailleurs ce régime maternel est responsable d'une augmentation significative du taux d'IL-6 chez le fœtus (+170%, $p < 0,05$) et chez les mères gestantes (+130%, $p < 0,05$). Cette forte concentration d'IL-6 inhibe le développement des neurites des neurones NPY de l'ARC (Sanders et al., 2014).

L'ensemble de ces résultats démontre qu'un régime HF pré-gestationnel est capable d'induire une altération du pic post-natal de leptine ainsi qu'une altération de la formation des réseaux neuronaux de l'ARC chez la descendance.

Tout comme le montrent certains régimes HF pré-gestationnels, un régime HF gestationnel peut induire une altération de la formation des réseaux neuronaux ainsi que du niveau d'expression de certains neuropeptides hypothalamiques. Un régime HF restreint à la gestation chez le rat stimule la prolifération des neurones ainsi que des cellules neuro-épithéliales du troisième ventricule de l'embryon. De ce fait, leur migration vers les neurones hypothalamiques est augmentée, résultant en une expression élevée des neuropeptides orexigènes (Chang et al., 2008, pour revue Sullivan et al., 2011). Une étude *ex-vivo* de neurones embryonnaires hypothalamiques à E19 chez le rat montre qu'un régime maternel HF modifie la morphologie des neurones, leur nombre ainsi que l'expression des

neuropeptides hypothalamiques. Le nombre de neurones exprimant NPY est augmenté (+240%, $p < 0,05$). Ces neurones sont parfaitement différenciés et présentent une expression du neuropeptide dans les corps cellulaires et les axones. Le taux d'ARNm de NPY est plus élevé (+117%, $p < 0,05$) tandis que les taux d'ORX et de MCH sont identiques (Poon et al., 2012). Des résultats similaires sont observés lors d'une étude *in-vivo* montrant à la naissance, une expression plus importante des neuropeptides NPY et AgRP (+100%, $p < 0,05$) chez les descendances HF et une expression plus faible du neuropeptide α -MSH (-100%, $p < 0,05$) (Stachowiak et al., 2013).

Ce régime altère également le développement neuronal au niveau extra-hypothalamique conduisant à l'âge adulte à des désordres aussi bien métaboliques que comportementaux ou cognitifs (Stachowiak et al., 2013, pour revue Sullivan et al., 2011). Une étude complémentaire chez le rat montre que ces altérations de formation des réseaux neuronaux sont liées à des modifications d'expression de facteurs de transcription spécifiques (TEF et YAP, impliqués dans la différenciation et la prolifération des organes durant le développement embryonnaire et notamment le développement neuronal). Un régime HF prénatal induit au niveau hypothalamique, une diminution d'expression de ces deux facteurs de transcription et une baisse de la neurogenèse au stade E19 (-45% pour TEF et -49% pour YAP, $p < 0,05$) ainsi qu'une diminution de YAP (+36%, $p < 0,05$) et une augmentation de TEF (+95%, $p < 0,05$) à P15 dans le PVN des descendances HF.

Un régime HF gestationnel suffit à induire des altérations du développement embryonnaire hypothalamique qui perdurent durant la période post-natale précoce.

2.3. Régimes maternels hyperlipidiques et inflammation

Certains régimes HF sont responsables d'une augmentation d'adiposité chez la mère et leur descendance. Cette augmentation de tissu adipeux est associée à une augmentation de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-1 β et le TNF α chez les mères gestantes. Cette inflammation est une cause potentielle de l'altération du développement cérébral de la descendance, les prédisposant au syndrome métabolique à l'âge adulte (Giriko et al., 2013, Sanders et al., 2014, Sullivan et al., 2015).

Un régime HF pré-gestationnel chez le rat induit une augmentation du tissu adipeux associée à une augmentation de concentration de TNF α et CD68 (un marqueur de

l'activation des macrophages). Ces résultats reflètent une inflammation locale, au niveau du tissu adipeux et systémique résultant en une insulino-résistance. A E18, les descendances HF présentent un petit poids corporel (-5%, $p < 0,05$). Ils rattrapent néanmoins ce déficit de poids en présentant même un surpoids au sevrage (+30%, $p < 0,05$) associé à une masse grasse plus importante (+93%, $p < 0,05$) (Reynolds et al., 2014). La consommation d'un régime HF pré-gestationnel par des souris gestantes, augmente l'activation de la microglie chez les nouveau-nés et persiste à l'âge adulte (figure 13) (pour revue Sullivan et al., 2011, Kang et al., 2014).

Ces études suggèrent qu'un régime maternel pré-gestationnel induit une inflammation chez la mère gestante. Les facteurs pro-inflammatoires maternels peuvent passer la barrière hémato-placentaire et altérer le développement embryonnaire de la descendance. L'environnement maternel HF expose également le fœtus à des niveaux élevés de nutriments et d'agents endocrines tels que les triglycérides, le glucose, la leptine, l'insuline. L'insuline maternelle ne peut être transportée *via* le placenta, ainsi une hyperglycémie maternelle provoque une hyperinsulinémie chez le fœtus. Par ailleurs, l'insuline est une hormone considérée comme un facteur de croissance et son hypersécrétion peut altérer le développement cérébral du fœtus (Gupta et al., 2009).

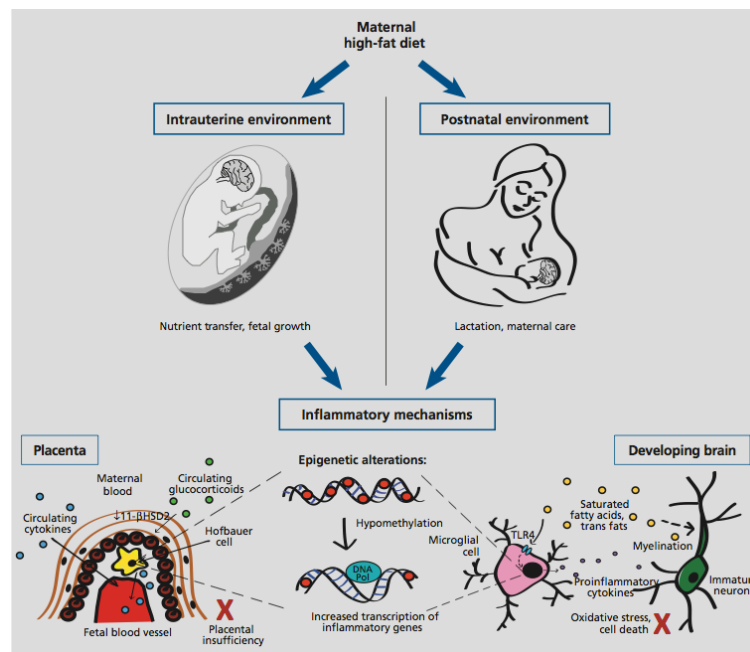


Figure 13 : Inflammation centrale induite par un régime maternel HF

Un régime maternel HF induit une programmation cérébrale chez la descendance. Les cytokines pro-inflammatoires maternelles passent dans la circulation du fœtus via le placenta menant d'une part à une insuffisance placentaire et donc à un retard de croissance intra-utérine et d'autre part endommage le développement cérébrale du fœtus. Tirée de la revue Bolton et Bilbo, 2014.

2.4. Régimes maternels hyperlipidiques et modifications épigénétiques

La notion d'épigénèse remonte à Aristote qui proposa que le développement progressif de l'embryon se faisait à partir d'un œuf indifférencié. Elle s'est longtemps opposée à la théorie de la préformation qui voyait l'embryon comme un être miniature où tous les organes préexistent. Mais c'est en 1942, à la suite d'études sur le développement embryonnaire et génétiques, que le terme épigénétique a été forgé par Conrad Waddington. L'épigénétique actuelle étudie les mécanismes moléculaires modulant l'expression du patrimoine génétique commun à la quasi-totalité des cellules des organismes multicellulaires. La notion de changement de caractères transmis au fil des divisions cellulaires sans mutations de l'ADN fut donnée par Robin Holliday en 1980. Le génome de l'homme, du rat et de la souris compte près de 22 000 gènes dont l'expression est finement régulée, en partie par des mécanismes épigénétiques. Le contrôle épigénétique de l'expression des gènes s'effectue au niveau transcriptionnel *via* des modifications de la chromatine, des méthylation d'ADN ou des histones. Elle se fait également au niveau post-transcriptionnel *via* de petits ARN non codant, notamment les microARN (miARN) (cf. chapitre III). L'épigénétique rend compte en particulier des interactions entre le génome et l'environnement.

2.4.1. Effet d'une surnutrition induite par la taille de la portée

Une surnutrition de la descendance chez la souris, durant la période post-natale précoce, mène à P21 à une augmentation permanente du poids corporel (+20%, $p < 0,0001$), de la masse grasse (+60%, $p < 0,0001$) ainsi qu'une diminution des dépenses énergétiques ($p < 0,01$). Ces altérations sont maintenues à P180. Ces changements physiologiques sont associés à une augmentation du taux de méthylation des gènes hypothalamiques *Nolz1* codant pour le facteur de transcription *Nolz1* impliqué dans la différenciation des cellules neuronales, la croissance axonale et les projections neuronales et *Aqp4* codant pour la protéine aquaporine 4 pore membranaire impliqué dans le transfert d'eau entre la circulation sanguine et le SNC.

Ces résultats montrent que la surnutrition précoce cause de subtiles modifications épigénétiques au niveau hypothalamique persistant à l'âge adulte et influençant l'homéostasie énergétique de l'organisme (figure 14) (Li et al., 2013).

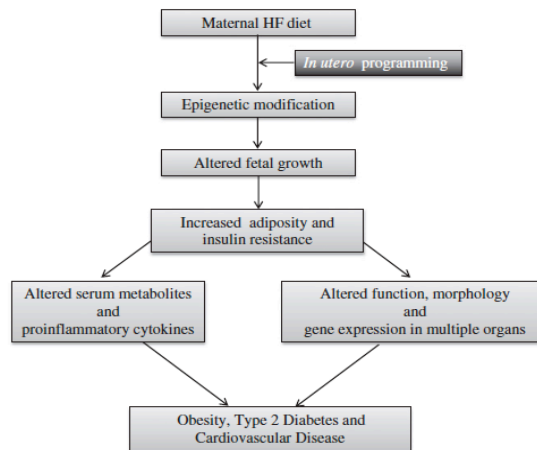


Figure 14 : Effets épigénétiques d’une exposition à un régime maternel hyperlipidique

Cette figure réunit les événements se produisant en réponse à une exposition à un environnement HF in utero et augmentant la susceptibilité de développer un syndrome métabolique à l’âge adulte. Tirée de la revue Williams, 2013.

L’ensemble des résultats présentés dans ce chapitre montre qu’un régime maternel HF induit des réponses adaptatives immédiates et prédictives chez la descendance. Cette programmation est responsable de nombreuses pathologies telles que l’obésité, le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires ou l’hypertension se déclarant à l’âge adulte. Ces pathologies peuvent être sous le contrôle de régulations épigénétiques post-transcriptionnelles.

Chapitre III : MicroARN

3.1. Découverte des microARN

En 1984, Jonathan a montré que l'injection d'un plasmide d'ADN recombinant codant l'anti-sens de l'ARNm de la tyrosine kinase (TK) dans des lymphocytes murins inhibe l'expression de la TK endogène (Izant et al., 1984). Quelques années plus tard, l'équipe de Moerman, observe un phénomène similaire lors de l'injection d'un plasmide codant l'anti-sens de l'ARNm de deux protéines musculaires chez *Caenorhabditis elegans*. La diminution d'expression de ces deux gènes se traduit par des altérations structurales, fonctionnelles et biochimiques dans les cellules musculaires de *C. elegans* (Fire et al., 1991).

En 1993, les équipes d'Ambros et Ruvkun réalisent des études sur le gène *lin-4* au cours du développement post-embryonnaire chez *C. elegans*. Dès ce moment *lin-4* est connu pour être un gène hétérochronique et nommé « small temporal » RNA (stARN). Ils mettent en évidence que *lin-4* ne code pas une protéine mais deux ARN de 22 et 61 nucléotides. Le KO du gène *lin-4* est responsable d'un retard d'expression du gène *lin-14* au cours du développement de *C. elegans* (Lee et al., 1993, Wightman et al., 1993). *Lin-4* est un régulateur négatif de l'expression du gène *lin-14*. Un autre ARN non codant (ARNnc) a été découvert chez *C. elegans*, *let-7*, et présente les mêmes caractéristiques que *lin-4*. Il est impliqué dans le passage du stade larvaire 4 au stade adulte par diminution de l'expression du gène *lin-41*. Ces découvertes ont stimulé les recherches sur ces petits ARNnc. Au début des années 2000, une quinzaine d'ARNnc ont été identifiés chez *C. elegans* et une centaine chez d'autres organismes dont l'homme (Lee et al., 2001, Bartel, 2004).

Les équipes d'Ambros et Ruvkun ont été les premiers à identifier le mode d'interaction entre les petits ARN et leurs cibles. Ils ont observé que cette régulation se faisait par complémentarité de bases entre la région 3'UTR (untranslated region) de l'ARNm de *lin-14* et la région 5' des petits ARN *lin-4* (Lee et al., 1993, Wightman et al., 1993).

En 1998, l'équipe de Fire découvre que l'injection d'ARN double brin (db) chez *C. elegans* diminue l'expression des gènes de manière plus efficace qu'un ARN simple brin

(sb) (Fire et al., 1998). Cette molécule d'ARN db de plusieurs centaines de paires de bases produit des fragments d'une vingtaine de bases baptisés ARN interférence (ARNi) et responsables du clivage et donc de la diminution d'expression de l'ARNm.

En 2001, une étude sur le développement de *C. elegans* montre que dicer, une protéine que l'on connaissait impliquée dans la voie de biosynthèse des ARNi est essentielle à la maturation des stARN. Les stARN faisaient donc partie du groupe des ARNi et ont pour rôle de diminuer l'expression de leurs gènes cibles (Fire et al., 1991). Ces études sur le rôle des petits ARNnc ont amené la communauté scientifique à renommer les stARN en microARN (miARN) (Lee et al., 1993, Lee et al., 2001, Bartel, 2004). Les miARN se définissent alors comme de petits ARNnc d'une vingtaine de nucléotides produits à partir d'un transcrit et impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle d'expression des gènes (Lau et al. 2001).

3.1.1. *microARN au cours de l'évolution*

Les nombreuses études réalisées sur les miARN ont permis de découvrir qu'un tiers des gènes de miARN identifiés chez *C. elegans* possèdent des orthologues chez des métazoaires. Les régions les plus conservées sont la région « seed » et une région en aval, comprenant les nucléotides 13 à 19 (Grimson et al., 2007). La région « seed » est la région localisée à l'extrémité 5' du miARN comprenant 7 nucléotides allant des nucléotides 2 à 8 et complémentaires en partie avec la région 3'UTR de ses ARNm cibles.

Chez les métazoaires, la complexification des organismes s'accompagne d'une complexification des génomes. L'émergence de nouveaux miARN au cours de l'évolution se fait par duplication ou création *des novo*. Au cours de l'évolution, de nouvelles fonctions ont émergé en même temps que de nouveaux miARN dans ces organismes plus complexes (Lee et al., 2007). Les primates ont ainsi acquis 84 nouvelles familles de miARN et les rongeurs 16 qui comprennent les familles miR-207, miR-327, miR-343, miR-344, miR-351, miR-434, miR-463, miR-471, miR-540, miR-541, miR-672, miR-673, miR-674, miR-872, miR-879 et miR-883 (Peterson et al., 2009). Aujourd'hui on compte 765, 1915 et 2588 gènes codant des miARN (miR gènes) chez le rat, la souris et l'homme respectivement (<http://www.mirbase.org/>).

3.1.2. Biosynthèse des microARN

Chez les mammifères, environ 50% des miARN sont localisés dans des introns (40% des miARN sont localisés dans des régions de gènes codant des protéines et 10% dans des introns de long transcrits non codant), un peu plus de 10% des miARN sont localisés dans des exons d'ARN non codants et 40% sont localisés dans des régions intergéniques (Rodriguez et al., 2004, Bartel, 2004). Les miARN codés par les introns n'ont à priori pas de promoteurs propres et leur transcription est régulée par les promoteurs de leurs gènes hôtes. Les miARN intergéniques sont sous le contrôle de leur propre promoteur (Hubé et al., 2015) (Bartel, 2004). De nombreux miARN sont localisés dans des « clusters » et ont souvent un profil d'expression similaire (Lagos-Quintana et al., 2001). La transcription de ces gènes est contrôlée par une même séquence régulatrice donnant lieu à un transcrit polycistronique (Lee et al., 2002). Ces miARN ont souvent mais pas toujours des fonctions liées.

3.1.2.1. Maturation des miARN intergéniques

Chez les mammifères, les gènes de miARN sont transcrits par une ARN polymérase II, en un transcrit primaire, le pri-miARN, d'une taille pouvant aller d'une centaine à des milliers de nucléotides. Ce pri-miARN contient plusieurs domaines tige-boucle (Bartel, 2002, Lee et al., 2007). Tout comme les ARNm, les pri-miARN présentent une coiffe à leur extrémité 5' phosphate (5'-Pi) et sont polyadénylés à leur extrémité 3' hydroxyl (3'-OH) (figure 15) (Han et al., 2006, pour revue Seitz et Zamore, 2006).

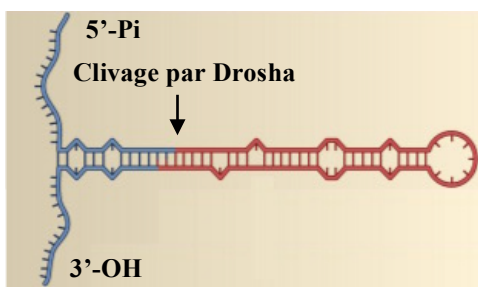


Figure 15 : Structure du pri-miARN

Le pri-miARN constitue la molécule précurseur du miARN. Il peut contenir plusieurs domaines tige-boucle. Il est pris en charge par un complexe multiprotéique pour sa maturation en pré-miARN. Tiré et modifiée de la revue : Seitz et Zamore, 2006

Le pri-miARN subit une maturation dans le noyau, par le complexe multiprotéique, « microprocesseur », constitué d'une molécule ribonucléase de type III, Droscha et d'une protéine, DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8). Le microprocesseur reconnaît le transcrit primaire par la présence d'un ARN simple brin aux extrémités 5'-Pi et

3'-OH et d'une trentaine de nucléotides entre ces extrémités et la boucle (Lee et al., 2002, Lee et al., 2003, Han et al., 2004, Han et al., 2006). La protéine Drosha, une RNase III, clive cette molécule à environ 11 paires de bases de la jonction simple brin-double brin et permet ainsi de définir une des extrémités du futur miARN (pour revue Seitz et Zamore, 2006). Cette maturation donne lieu à un transcrit d'environ soixante-dix nucléotides présentant toujours une structure tige-boucle et comprenant une extrémité 5'-Pi et une extrémité 3'-OH protrusive, le pré-miARN (figure 16) (Westholm, et al., 2011).

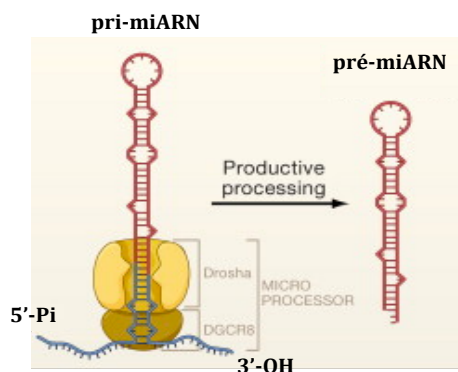


Figure 16 : Maturation du pri-miARN en pré-miARN

La maturation du pri-miARN en pré-miARN se fait par le complexe protéique multiprocesseur qui donne lieu à une molécule de structure-tige boucle comprenant des extrémités 5'-Pi et 3'-OH protrusives. Tiré et modifiée de la revue : Seitz et Zamore, 2006.

L'extrémité 3'-OH protrusive est nécessaire à la reconnaissance du pré-miARN par la protéine de transport, exportine 5. La taille de la tige est également un élément clé de l'interaction entre l'exportine 5 et le pré-miARN, elle doit excéder 18 paires de bases. L'exportine 5 est associée à un cofacteur GTPase Ran. Ce complexe permet le passage du pré-miARN du noyau au cytoplasme mais protège également la dégradation du pré-miARN par des exonucléases. L'hydrolyse du RanGTP en RanGDP est responsable du relargage du pré-miARN dans le cytoplasme où il subira une seconde maturation (Zeng et al., 2004).

Cette seconde maturation est réalisée par Dicer, une ribonucléase de type III. Elle produit une molécule d'ARN double brin d'une vingtaine de nucléotides avec une extrémité 5'-Pi et une extrémité 3'-OH sortante caractéristiques des clivages par les RNases III ; Dicer et Drosha. La protéine Dicer est constituée d'un domaine PAZ reconnaissant les extrémités 3'-OH protrusives, d'un domaine de fixation à l'ARN double-brin et deux domaines RNase III (RNase IIIa et RNase IIIb) constituant le domaine catalytique, responsable du clivage du pré-miARN. Le domaine RNase IIIa clive l'extrémité 3'-OH et le domaine RNase IIIb clive l'extrémité 5'-Pi. Les domaines PAZ et RNase III sont séparés par une vingtaine de nucléotides (Macrae, 2013, Zhang et al., 2004). Le duplex produit par Dicer correspond à la tige de la structure tige-boucle. Cette molécule d'ARN db produit deux miARN nommés miR-5p et miR-3p. La protéine Dicer accompagnée du miARN

interagit avec la protéine TRBP (transactivation response RNA binding protein), comprenant un domaine de fixation à l'ARN double brin, et la protéine argonaute 2 (AGO 2) pour former un complexe ribonucléoprotéique, le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) (Westholm J.O., et al., 2011).

La protéine AGO 2 est responsable de l'activité catalytique du complexe. Elle possède trois domaines, un domaine PAZ responsable de la reconnaissance et de la fixation à l'extrémité 3'-OH protrusive du duplexe (Macrae, 2013), un domaine MID capable de fixer le 5'Pi du duplex et un domaine PIWI constituant le domaine catalytique de la protéine et impliqué dans la sélection du brin devant intégrer le complexe RISC (Parker, 2005). La maturation du pré-miARN en miARN par Dicer et l'assemblage du complexe RISC sont couplés (Gregory et al., 2005) (figure 17).

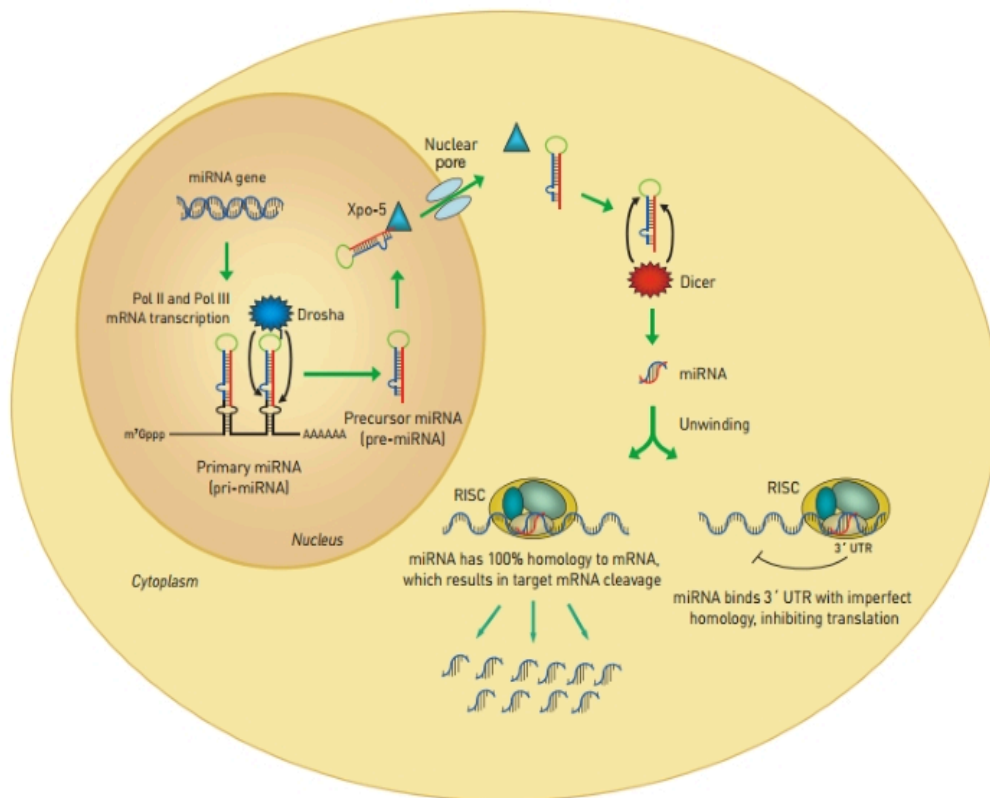


Figure 17 : Voie de biosynthèse des microARN

Les miARN sont synthétisés à partir de molécules précurseurs les pri-miARN et pré-miARN. le pri-miARN subissent une maturation dans le noyau en pré-miARN. Ce dernier est exporté dans le cytoplasme où il subit à son tour une maturation en un ARN double brin. Un des deux brins, qui est alors un miARN, est incorporé dans le complexe RISC et interagit avec leurs ARNm cibles menant à l'inhibition de leur traduction ou à leur dégradation. Tiré du site www.thermofisher.com

3.1.2.2. Maturation des miARN introniques

Les ARN provenant de régions introniques du génome sont qualifiés de mirtrons. Ces introns forment une molécule de structure tige-boucle de type pré-miARN (Chiang et al., 2010, Ladewig et al., 2012, Havens et al., 2012). La maturation des mirtrons se dispense de la voie de maturation drosha/DGCR8 (DiGeorge syndrome chromosomal region 8). La maturation de ce pré-miARN suit la même voie que les miARN (Berezikov et al., 2007, Ladewig et al., 2012). Il existe trois sous classes de mirtrons, les mirtrons ayant une extension en 5' (mirtrons 5'), les mirtrons ayant une extension en 3' (mirtrons 3') et les mirtrons dits conventionnels qui correspondent à l'intron entier (Ladewig et al., 2012) (figure 18). Ces extrémités sont coupées par un exosome ARN qui est un complexe d'exonucléases (Westholm et al., 2011) et donnent lieu à un duplexe. Chez les mammifères, 477 mirtrons ont nouvellement été identifiés dont 17 mirtrons 3', 41 mirtrons conventionnels et 419 mirtrons 5'. Les mirtrons représentent un tiers à un quart des miARN (Ladewig et al., 2012).

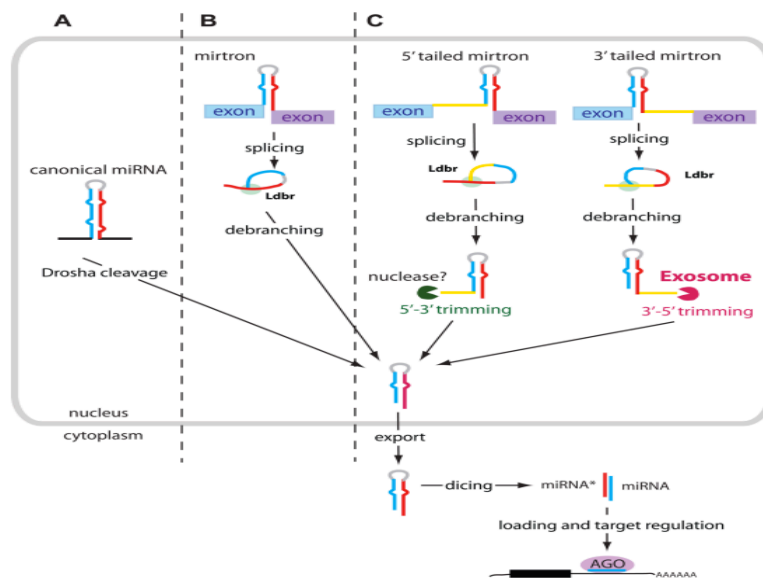


Figure 18 : Biosynthèse des mirtrons. A. Voie canonique de biosynthèse des miARN. B. Voie de biosynthèse des mirtrons conventionnels. C. Voie de biosynthèse des mirtrons 5' et des mirtrons 3'.

Toutes ces voies de biosynthèse débutent d'un pré-miARN qui subit différentes maturations selon qu'ils proviennent de régions intergénomiques, d'exons ou d'introns menant à un miARN ou à un des trois types de mirtrons. La maturation via Drosha puis Dicer donne lieu à un miARN, la maturation par épissage et Dicer donne lieu à un mirtron. Tiré de : Westholm et Lai, 2011.

3.1.2.3. IsomiRs

La population de miARN dans un échantillon est complexe par l'existence de plusieurs centaines de gènes de miARN (gènes miR) dans le génome et par le fait qu'un gène de miR produit deux types de miARN matures. Chacun de ces deux types regroupent de nombreuses isoformes, les isomiRs, différant les uns des autres par un ou quelques nucléotides à leurs extrémités. Dans les bases de données un miARN est identifié par un isomiR. Les isomiRs ont plusieurs origines ; le clivage imprécis des pri- et pré-miARN par les enzymes dicer et/ou drosha, l'action d'exonucléases et de transférase aux extrémités 3' et 5'. Quelques rare cas d'« RNA editing » (une substitution de bases au sein de la séquence) ont été rapportés. Ces différences donnent lieu à trois classes d'isomiRs ; les 5'-isomiRs, les 3'-isomiRs et les isomiRs polymorphiques. Les 5' isomiRs et 3' isomiRs sont différents par leur extrémité 5' et 3' respectivement. Quant aux isomiRs polymorphiques, ils diffèrent par leur séquence nucléotidique interne (figure 19).

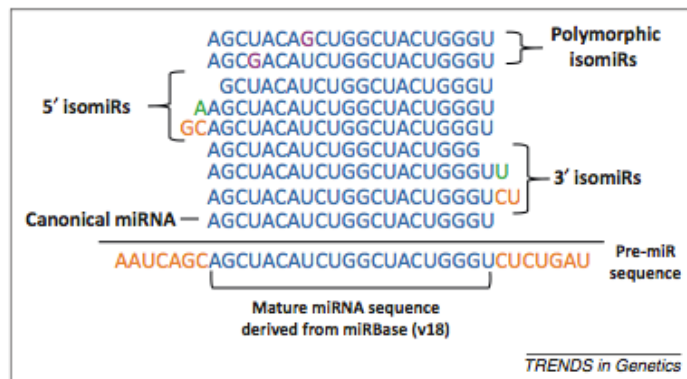


Figure 19 : miARN et isomiRs

Les séquences en bleu correspondent à la séquence du miARN répertorié dans la base de données miRBase (miARN canonique). Les 5' et 3' isomiRs présentent des différences à leurs extrémités 5' et 3' respectivement. Les nucléotides orange correspondent à une différence de clivage du pré-miARN alors que les nucléotides en vert correspondent à une addition de base. Les bases en violet correspondent à une substitution de base au sein de la séquence de l'isomiR. Tiré de Neilsen et al., 2012.

Les 5'-isomiRs peuvent avoir des gènes cibles différents, étant donné qu'ils présentent pour un miARN donné, des différences dans leur région « seed » (Neilsen et al., 2012). Une étude récente a observé que 31 à 46% des 5'-isomiRs présents dans les profils d'expressions de miARN n'ont pas les mêmes gènes cibles putatifs que le miARN répertorié et 22% ciblent les mêmes gènes. Les 3'-isomiRs peuvent cibler les mêmes gènes que les miARN

répertoriés puisqu'ils partagent la même région « seed ». Les 3'-isomiRs sont fréquents, ils représentent 40 à 50% de la population de miARN tandis que les 5'-isomiRs ne représentent que 5 à 15%. Des études d'expression des isomiRs dans différents types cellulaires et différents tissus ont montré qu'ils avaient été exprimés de manière type-cellulaire-spécifique (Nielsen et al., 2012, Guo et al., 2014, Tan et al., 2014).

3.1.3. Mécanismes d'action des microARN chez les mammifères

3.1.3.1. Sites d'interaction du miARN

Associés au complexe RISC, les miARN interagissent avec leurs ARNm cibles et régulent leur expression via deux mécanismes, dont l'importance relative fait toujours l'objet de controverses : l'inhibition de leur traduction ou leur dégradation (Shin et al., 2010). Cette interaction se fait par complémentarité de bases entre la région « seed » du miARN et la région 3'UTR du messenger (région « anti-seed »). L'importance fonctionnelle de la région « seed » est prouvée par sa conservation au cours de l'évolution (Brennecke et al., 2005, Shin et al., 2010). L'appariement de la région «seed » du miARN avec son messenger cible est décliné en 4 types qui présentent des efficacités de régulation différentes ; un 6mer, deux 7mer (7mer-m8 et 7mer-A1) et un 8mer. Le 6mer est un appariement parfait de 6 nucléotides allant du nucléotide 2 au nucléotide 7. Le 7mer-m8 est un 6-mer supplémenté d'un nucléotide en position 8 et le 7mer-A1 est un 6mer supplémenté d'une adénosine en position 1. Le 8mer est un 6mer supplémenté d'un appariement du nucléotide 8 et d'un A en position 1 (figure 20). Les 7mer et le 8mer sont les plus importants et les plus efficaces, 19%, 25%, et 43% des ARNm contiennent dans leurs régions 3'UTR des 7mer-A1, 7mer-m8 et 8mer respectivement (Grimson et al., 2007).

L'efficacité d'appariement varie selon plusieurs paramètres ; la présence d'un A en aval de la région « anti-seed » et un A ou un U en amont de la région « seed ». La région « anti-seed » est souvent positionnée dans un environnement riche en AU, à proximité du codon stop dont elle doit être espacée d'environ 15 nucléotides, ou proche de l'extrémité de la région 3'UTR (Lewis et al., 2005, Nielsen et al., 2007, Grimson et al., 2007, Bartel, 2009). La région 3'UTR du messenger peut contenir plusieurs régions « anti-seed » lui procurant une capacité d'inhibition plus importante. Un espacement de 8 à 40 nucléotides entre deux régions « anti-seed » induit une meilleure efficacité (Chen et al., 2015).

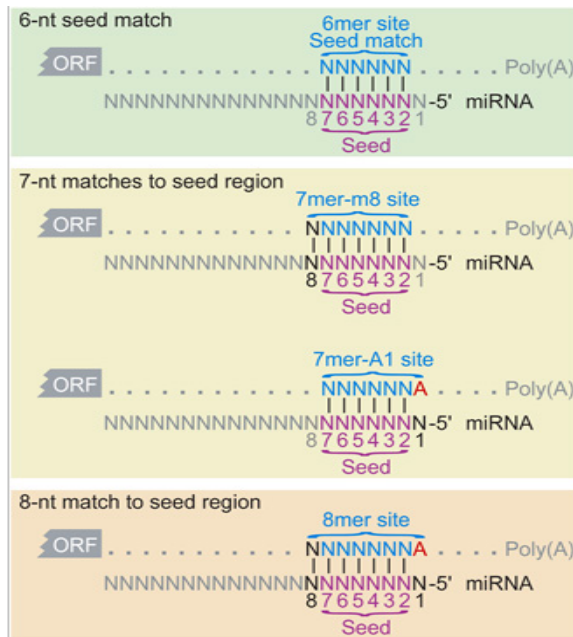


Figure 20 : Différents appariements des régions « seed » et 3'-UTR

L'appariement des miARN avec leurs ARNm cibles se fait par complémentarité de bases. Il existe quatre types d'appariement : le 6-mer, le 7-mer-m8, le 7-mer-A1, le 8-mer. Tiré de : Grimson et al., 2007.

Les miARN n'agissent pas seulement par complémentarité de leur région « seed » mais également par extra-complémentarité de leur région 3' (pour revue Seitz et Zamore, 2006, Chi, 2012, Martin et al., 2014). Les interactions entre la région 3' du miARN et la région 3'UTR de l'ARNm ont des effets modérés sur la stabilité et/ou la traduction de ces ARNm (Friedman et al., 2009, Helwak et al., 2013, Chen et al., 2015). Néanmoins, si l'appariement de la région 5' contient moins de 7 résidus, un appariement de type G:U ou des mésappariements, il est nécessaire d'avoir en plus un appariement de la région 3' du miARN. Il existe plusieurs types d'interactions 3', un appariement supplémentaire des résidus 13 à 16 améliore la spécificité d'interaction entre le miARN et son ARNm cible. Un appariement complémentaire en 3', qui correspond à un appariement plus étendu, compense un mésappariement dans la région 5' (Lewis et al., 2005, Bartel, 2009). L'appariement de la région 3' du miARN n'est pas fréquent, il représente moins de 10% des appariements (Lewis et al., 2003, Brennecke et al., 2005, Grimson et al., 2007) (figure 21).

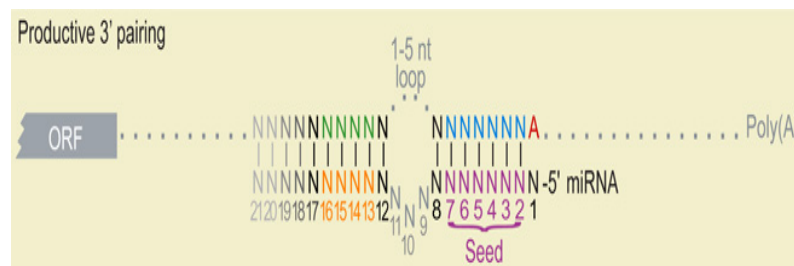


Figure 21 : Appariements des régions « seed » et 3' du miARN

En plus de l'appariement de sa région « seed », représentée en violet, avec son messenger cible, le miARN peut également interagir via sa région 3', représentée en orange. Tiré de Grimson et al., 2007.

Des études réalisées par Bartel en 2010 ont permis de mettre en évidence l'existence d'un autre type d'interaction faisant intervenir la région centrale du miARN. Cette région est caractérisée par un appariement de 11 nucléotides débutant aux résidus 3, 4 ou 5 (Grimson et al., 2007, Shin et al., 2010). Ces interactions sont occasionnelles tout comme les interactions avec la région 3' et représentent ensemble moins de 10% des interactions. Pourtant l'appariement de la région centrale seule sans interaction de la région « seed » avec l'ARNm est suffisant pour mener à son inhibition (Martin et al., 2014).

3.1.3.2. Sites d'interaction de l'ARNm cible

Des études récentes d'interactome (interaction entre miARN, ARNm et AGO2) ont montré que le miARN pouvait, en plus de la région 3'UTR, interagir avec les régions codantes et 5'UTR de leurs gènes cibles. Les interactions se font plus fréquemment avec les régions codantes (ORF) et les régions 3'UTR de l'ARNm (Kloosterman, 2004, Lytle et al., 2007, Bartel, 2009, Helwak et al., 2014)(figure 22).

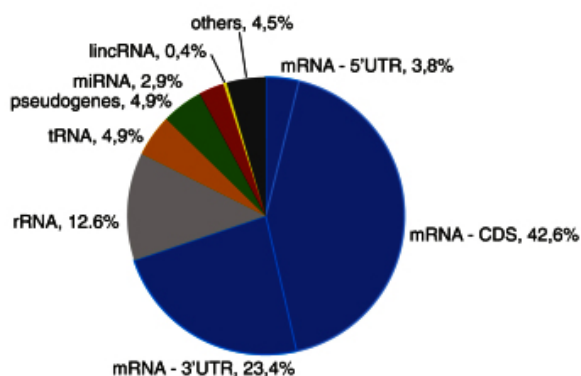


Figure 22 : Identification des ARN interagissant avec les miARN

Les miARN interagissent principalement avec les ARNm cibles, dans 70% des cas mais également avec d'autres molécules d'ARN comme les ARNr ou ARNt qui représentent à eux deux 17,5% des interactions. Tiré de Helwak et al., 2013.

Du fait de la petite taille de la région « seed » et donc du grand nombre de séquences complémentaires au sein du transcriptome, un miARN peut cibler des centaines d'ARNm. Chez l'homme, plus de 60% des ARNm seraient soumis au contrôle de miARN (Friedman, 2009).

Après action du miARN sur son ARNm cible, le miARN reste intact et peut cibler d'autres ARNm (Elbashir et al., 2001, Hutvagner et al., 2002). Les miARN d'une même famille possèdent la même séquence « seed » et ciblent les mêmes ARNm mais peuvent également cibler des gènes différents. Les transcrits possédant une séquence extra-

complémentaire à la région 3' d'un miARN peuvent discriminer les différents miARN d'une même famille. Prenons l'exemple de trois miARN, miR-2, miR-6 et miR-11 qui possèdent la même séquence « seed » et ciblent les mêmes gènes, mais avec une efficacité différente car seul miR-2 possède une séquence complémentaire en 3' et présente ainsi la meilleure efficacité (Lewis et al., 2003, Brennecke et al., 2005).

Des études de transfection cellulaire ont montré que l'activité des miARN est dépendante de l'abondance de leurs gènes cibles. Plus le gène cible est abondant moins son inhibition est efficace. Pour exemple, un gène cible peu abondant a une inhibition dix fois supérieure à un gène cible très abondant. Ce phénomène est appelé « effet de dilution » (Arvey et al., 2010).

3.1.3.3. Prédiction des cibles des microARN

Les miARN sont une des classes les plus importantes de régulateurs d'expression de gènes chez les métazoaires. L'interaction du miARN avec ses cibles est dépendant de la stabilité de l'appariement de la séquence « seed » avec sa région 3'UTR cible et de l'abondance de la cible dans la cellule en question. Prenons l'exemple du miARN lsy-6 qui possède une faible stabilité d'appariement de sa séquence « seed » et une forte abondance de ses régions 3'UTR cibles et qui ne présente pas une bonne efficacité d'inhibition de ses gènes cibles. Pour qu'un miARN ait une bonne efficacité à inhiber ses gènes cibles, il faut une forte stabilité de l'appariement de la séquence « seed » avec la région 3'UTR de ses gènes cibles et une faible abondance des cibles dans la cellule (Garcia et al., 2011).

L'importance des miARN est supportée par leur expression tissu-spécifique, stade de développement-spécifique et leur conservation au cours de l'évolution (Lewis et al., 2003). Ces dernières années, de nombreux miARN ont été impliqués dans diverses désordres physiologiques et processus cellulaires chez les mammifères, comme les maladies cardiovasculaires, le métabolisme, le cancer, la différenciation cellulaire ou encore au cours du développement. Let-7 et son régulateur lin-28 semblent impliqués dans le métabolisme glucidique (Nguyen et Zhu, 2015).

De nombreuses études ont montré que les knock-out de certains miARN ou des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des miARN présentaient des phénotypes délétères. C'est pour toutes ces raisons qu'il est important de comprendre comment agissent

ces petits ARNnc pour réguler l'expression des gènes et qu'il est nécessaire d'identifier leurs gènes cibles.

Pour l'identification des gènes cibles, des techniques de séquençage haut-débit et des outils bio-informatiques ont été mis au point. Ces outils bio-informatiques utilisent plusieurs critères ; la conservation au cours du développement, un appariement quasi parfait de la région « seed » avec la région 3'UTR, l'environnement de la région « seed », la stabilité thermodynamique et l'accessibilité de la cible (Lewis et al., 2005, Grimson et al., 2007; Kertesz et al., 2007, Friedman et al., 2009, Marín et al., 2012, Wang et al., 2015). Le serveur PACMIT utilise, pour la prédiction des gènes cibles de miARN, une approche simple se basant sur deux critères, la conservation du miARN au cours de l'évolution et/ou l'accessibilité de la cible. En utilisant cette méthode, on observe que les miARN fortement conservés au cours de l'évolution ciblent en moyenne 48,5 gènes et les miARN faiblement conservés ne ciblent que 4,3 gènes en moyenne. Les miARN les plus conservés ont accumulés des cibles au cours de l'évolution. En fonction du degré de conservation des miARN, une méthode ou l'autre est privilégiée (Marín et al., 2012). L'algorithme TargetScan est plus complexe et combine deux critères, les interactions thermodynamiques entre les bases du duplexe miARN:ARNm et la conservation des miARN et de leurs cibles au cours de l'évolution (Lewis et al., 2003). Une fois les gènes cibles identifiés, ils sont classés selon différents critères ; 1/ la présence de séquences parfaitement complémentaires à la séquence « seed » du miARN au sein de la région 3'UTR, 2/ la présence d'un appariement étendu de part et d'autre de la séquence « seed », 3/ la présence d'une séquence complémentaire à la région 3' du miARN. Puis à chaque interaction miARN:ARNm une énergie libre, un Z score et un rang leur est assigné. Ces études bio-informatiques ont permis d'observer plus de mille miARN ciblant potentiellement des centaines d'ARNm. Seule une petite fraction de ces interactions ont été validées expérimentalement. Très récemment plusieurs études ont montré que la prédiction des cibles était plus fiable lorsque ces différentes méthodes complémentaires étaient combinées (Zhang et al., 2010, Shirdel et al., 2011, Pio et al., 2014, Le et al., 2015, Wang et al., 2015).

3.1.4. *microARN au cours du développement*

Les miARN sont impliqués dans de nombreux processus biologiques fondamentaux tels que la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire, le développement du système nerveux, le système immunitaire et le métabolisme (Williams, 2008). Les miARN sont

exprimés de manière tissu-spécifique et stade-spécifique. Saugstad a pu dénombrer entre 40 et 50 miARN exprimés dans des régions bien spécifiques du cerveau. Dont un certain nombre spécifiquement exprimés dans les neurones ; miR-9, miR-124, miR-135 , miR-153, miR-183, miR-219. miR-23, miR-26 et miR-29 ont une expression plus importante dans les astrocytes (Sempere et al., 2004, Lim et al., 2005, Smirnova et al., 2005, Saugstad, 2010, Hollins et al., 2014).

Prenons l'exemple de miR-9, un miARN fortement conservé au cours de l'évolution. Il est exprimé chez les vertébrés au cours du développement et dans le système nerveux central mature. Ce miARN est impliqué dans la différenciation de certaines populations neuronales. L'expression de miR-9 et de miR-124 suffit à différencier les fibroblastes humains en neurones. miR-9 est également exprimé dans les axones et les dendrites des neurones différenciés. Une inhibition de miR-9 dans des neurones en culture augmente la taille des axones et diminue le nombre de dendrites (Coolen et al., 2012).

Chez le porc, une augmentation d'expression de plusieurs gènes de miARN est observée au cours du développement dans le cortex et le cervelet (à 50 jours embryonnaires (E50), à E100 et à l'âge adulte (3mois)). La famille des gènes mir-29 en est un exemple. Durant la période post-natale précoce, une augmentation d'expression des gènes de miR-29 est observée. C'est à cette période que les neurones subissent leur différenciation finale. Cependant l'expression maximale de miR-29 est observée à l'âge adulte. Période durant laquelle a lieu la myélinisation, la formation des synapses et leur plasticité (Podolska et al., 2011).

Les miARN sont également des marqueurs d'une exposition à un environnement particulier *in utero* et sont des candidats intéressants concernant l'état physiologique des descendants adultes (cf. partie II). Une analyse par micro-array du profil d'expression des miARN du foie des descendants souris a permis d'identifier 10 miARN surexprimés et 23 sous-exprimés après une exposition à un régime hyperlipidique *in utero* (Zhang et al., 2009, Kappil et al., 2014).

OBJECTIFS

Un environnement périnatal approprié est crucial pour un développement et une programmation métabolique fonctionnelle chez la descendance. Les changements métaboliques sont fréquemment sous-tendus par des différences d'expression de gènes impliqués dans la régulation des voies métaboliques correspondantes. Par ailleurs les miARN sont de potentiels candidats du contrôle épigénétique de l'expression des gènes.

Mon travail de thèse a consisté à étudier, dans le cadre du concept de la DOHaD, la programmation d'expression des miARN de l'ARC de rat par un régime maternel hyperlipidique. Cette question a nécessité des études d'animalerie, de physiologie, de biologie moléculaire et de bio-informatique. J'ai été en charge plus particulièrement des parties physiologie et biologie moléculaire. Nous avons établi l'impact de deux régimes HF sur les homéostasies énergétique et glucidique de la descendance mâle. Nous avons également établi l'impact d'un de ces régimes sur les profils d'expression de miARN dans l'ARC de la descendance mâle, de la naissance à sept mois.

Les résultats sont présentés en quatre études décrivant :

- I. La méthodologie développée
- II. L'effet direct d'un régime hyperlipidique périnatal sur l'expression de miARN dans l'ARC/EM de la descendance de la naissance au sevrage
- III. La programmation d'expression des miARN dans l'ARC de la descendance adulte par un environnement périnatal hyperlipidique
- IV. L'effet de la balance entre protéines et carbohydrates de régimes périnataux hypercaloriques sur la programmation métabolique de la descendance

RESULTATS EXPERIMENTAUX

ETUDE I

Article publié dans la revue *Experimental Physiology* : Baroin-Tourancheau A, Benigni X, Benoit C, Doubi-Kadmiri S, Vacher CM, Taouis M, Amar L. (2014). Keys for microRNA expression profiling of single rat hypothalamic nuclei and multiplex sequencing strategies. 99(1):72-7.

STRATEGIE DE SEQUENÇAGE MULTIPLEXE ET PROFILS INDIVIDUELS D'EXPRESSION DE MICROARN DES NOYAUX HYPOTHALAMIQUES CHEZ LE RAT

Cet article publié en 2014 récapitule la stratégie mise en place pour caractériser les profils d'expression de miARN de noyaux hypothalamiques individuels. La mise en place de cette stratégie a démarré avant le début de ma thèse. J'ai participé à son amélioration jusqu'à la forme finale que j'ai utilisée dans les travaux résumés dans les études II, III et IV de cette section.

Le génome du rat code plusieurs centaines de miARN. Chaque miARN cible plusieurs centaines de gènes et réciproquement chaque gène est susceptible d'être régulé par plusieurs miARN. En conséquence, la connaissance de la régulation de l'expression du génome par les miARN repose sur la caractérisation de l'ensemble des miARN (miRNomes) et des ARNm (transcriptome) exprimés. Dans la plupart des études, les miARN sont étudiés un à un, ou en petit nombre.

Dans notre étude, nous avons voulu nous donner les moyens d'identifier des populations de miARN dans leur globalité. Les technologies haut-débit de micro-array ou de TaqMan Low Density Array (TLDA) ne permettent ni d'identifier de nouveaux miARN, ni d'analyser individuellement les isomiRs ou les miARN membres d'une même famille qui se différencient par une ou quelques bases et assurent potentiellement des régulations différentes (cf. paragraphe 3.1.2.3). Au contraire, les techniques de séquençage haut débit permettent de passer outre ces trois limites. La technologie Illumina génère des centaines de millions de lectures et est particulièrement bien adaptée à l'établissement de l'expression des miRNomes. C'est cette technologie que nous avons choisi d'utiliser. Elle repose sur la construction de banques d'ADNc en six étapes : purification des ARN totaux, enrichissement en ARN de petite taille (18 à 36 bases), ligation d'adaptateurs aux extrémités 3' puis 5' des ARN, reverse-transcription (RT) et amplification par PCR.

Dans la plupart des études, pour des raisons quantitatives (faible quantité de miARN), les miARN sont purifiés à partir de « pool » d'ARN totaux provenant de plusieurs individus et/ou à partir d'hypothalamus entier. En conséquence, les différences génétiques et/ou épigénétiques interindividuelles sont gommées et/ou les profils d'expression propres à certains noyaux hypothalamiques sont dilués. Nous avons choisi d'utiliser l'avantage

procuré par le rat (sa taille) pour construire une banque d'ADNc individuelle et établir les profils d'expression de miARN pour chaque noyau hypothalamique prélevé. Dans cette étude comme dans les suivantes, nous avons utilisé de nombreux réplicas pour établir autant de profils individuels d'expression de miARN et mener une analyse statistique sur la totalité des miARN. La technologie de séquençage haut-débit permet un multiplexage important d'échantillons à un coût compatible avec les finances d'un laboratoire académique. Dans notre démarche, nous confirmons les différences d'expression des miARN par l'utilisation de la technologie indépendante de RT-qPCR. Dans les premières technologies de multiplexage, l'insertion d'un « tag » se faisait à la première étape de construction des banques lors de la ligation. Cette approche qui s'effectuait sur des acides nucléiques simples brins susceptibles de présenter des conformations tridimensionnelles variables à basse température (température de ligation) induisait des biais dans les profils d'expression. Les perfectionnements technologiques que nous avons développés par la suite (cf. étude II) qui introduisent le « tag » à l'étape d'amplification, à haute température, ont résolu ces problèmes.

Dans l'étude pilote rapportée par cet article, nous avons établi et comparé les profils d'expression des miARN d'ARC de 7 jeunes mâles adultes (P75). Nous avons identifié 300 miARN. Les 100 miARN les plus fortement exprimés représentent plus de 97% du nombre de lectures totales. Nous avons cherché à évaluer l'homogénéité d'expression de ces miARN entre les différents réplicas biologiques. Pour cela nous avons calculé les coefficients de variation de chaque miARN (écart-type/moyenne ; CV). Nos travaux montrent que les profils d'expression d'ARC sont très semblables entre réplicas. Deux miARN (miR-182-5p et miR-183-5p) présentent une exceptionnelle variation d'expression d'un facteur 150 entre réplicas. L'expression de ces deux miARN co-variait entre les sept profils d'ARC, probablement en conséquence de la proximité physique de leurs gènes (10 kb) et de leur co-localisation sur le même pré-miARN. Des études complémentaires des transcriptome et/ou protéome sont nécessaires pour analyser les conséquences de la forte variation d'expression de miR-182-5p et miR-183-5p entre les différents noyaux arqués.

En conclusion, l'utilisation combinée des technologies Illumina et du multiplexage permettront d'analyser un grand nombre d'échantillons et/ou de conditions physiologiques. La caractérisation des miRNomes individuels de petites structures cérébrales est possible et peut être utilisée pour la compréhension des mécanismes moléculaires et pathologiques sous-jacents.

NB : Dans l'étude II nous avons utilisé des animaux issus d'une reproduction indépendante de celle utilisée dans cette étude I. Nous avons observé à nouveau une forte variation de l'expression des miR-182-5p et miR-183-5p. Cette variation d'expression n'est pas observée chez la descendance plus jeune (P4 à P28) ou plus âgée (P216). Cette variation d'expression caractérise spécifiquement le stade juvénile (P75).

KEYS FOR MICRORNA EXPRESSION PROFILING OF SINGLE RAT HYPOTHALAMIC NUCLEI AND MULTIPLEX SEQUENCING STRATEGIES

Baroin-Tourancheau A.1,2, Benigni X. 1,2, Benoit C. 1,2, Doubi-Kadmiri S. 1,2, Vacher CM. 1,2, Taouis M.1,2 and Amar L. 1,2*

1 Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, University of Paris-Sud 11, UMR 8195, Orsay, F-91405, France.

2 Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, CNRS, Centre de Neurosciences, Paris-Sud UMR8195, Orsay, F-91405, France.

Correspondence should be addressed to Laurence Amar

tel : 33 1 69 15 66 38, fax : 33 1 69 15 77 26

email: laurence.amar@u-psud.fr

ABBREVIATIONS:

ARC : arcuate nucleus,

miR: miRNA-encoding gene

miRNA : microRNA

mRNA : messenger RNA

PCR : polymerase chain reaction

RT : reverse transcription

RT-qPCR: reverse transcription followed by quantitative polymerase chain reaction

What is the central question of this study?

Establishing a high number of miRNA expression profiles of individual hypothalamic nuclei of single rats.

What is the main finding and what is its importance?

This can be achieved at a cost compatible with laboratory finance by using tagged cDNA libraries constructed from purified small RNAs and a multiplex sequencing strategy.

ABSTRACT

Integrative research has taken on the challenge of addressing questions in physiology by using novel knowledge and novel techniques. Recently small and long non-coding RNAs have emerged as key regulators of gene expression while next-generation sequencing technologies have revolutionized the characterization of genomes and gene expression. MicroRNAs (miRNAs) are RNAs of 18-24 bases that have been known to regulate gene expression in mammals for a decade now. Here we first make points on the miRNA world and on the advantages of high-throughput sequencing technologies for establishing miRNA expression profiles. Hypothalamus harbors a dozen specialized areas or nuclei, the sampling of which is required to establish physiologically relevant miRNA expression profiles. MiRNA expression profiling from single animals is also important for investigating potential genetic or epigenetic differences between individuals. Establishing a high number of miRNA expression profiles of individual hypothalamic nuclei of single rats at a cost compatible with laboratory finance can be achieved by using tagged cDNA libraries constructed from purified small RNAs and a multiplex sequencing strategy. We continue this report by surveying specificities of the different strategies that are used at present for constructing tagged cDNA libraries and provide a comparative analysis of miRNA expression profiles from hypothalamic arcuate nuclei (ARCs) of seven male Wistar rats.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of 18-24 bases that regulate gene expression by modulating the translation and/or stability of messenger RNAs (mRNAs). This achieves post-transcriptional repression of protein production. Experimental data and bioinformatic analysis have been used for miRNA characterization (Chiang et al., 2010). The latest version of the miRBase database (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011), a central repository for miRNAs, lists 492, 848 and 2214 miRNA-encoding (miR) genes in the rat, mouse and human genomes, respectively. A large part of the differences in the miRNA contents of these genomes is due to differences in their bioinformatic investigation.

In mammals miRNAs are essential during spermatogenesis, in post-implantation development and adult somatic tissues. Brain appears as the tissue expressing by far the highest number of specific miRNAs. When applying a conservative cut-off of a 5-fold expression level difference between several rat tissues, 133 miRNAs were specifically identified in brain (Linsen et al., 2010). By comparison, only 35 miRNAs were specifically characterized in testis. In order to facilitate a systematic analysis of miRNA expression and regulation in specific neuron types in mice, He et al. (2012) established a miRNA-tagging and affinity purification method that targets cell types through the Cre-loxP system. *Rattus norvegicus* is largely used to study neuronal plasticity and dysfunction during embryogenesis and adulthood. Due to the technical difficulties to obtain gene knock-out or knock-in rats, the sampling of brain structures or sub-structures represents an alternative to determine the physiological relevance of miRNA expression pattern changes and the impact of these changes on brain functions.

High-throughput sequencing technologies are particularly well adapted for miRNA expression analysis of brain structures or sub-structures. In many experiments, multiple animals are used per sample and RNAs are pooled. While this approach is useful to provide miRNA expression trends in specific experimental conditions, it does not take into account potential genetic or epigenetic differences between individuals. At a time where these differences are more appreciated for their impact on the different answers that are provided by different individuals in one given environment, we have developed an approach that

uses high-throughput sequencing technologies to characterise miRNA expression of individual hypothalamic nuclei of single rats.

The complex world of miRNAs

MiRNAs are processed from cytoplasmic RNA imperfect hairpins of 70 bases into duplexes of 22 bases, one strand of which becomes ultimately incorporated in RNA-Induced Silencing Complexes (Fig. 1). Depending on the hairpin, miRNAs are either predominantly produced from one hairpin arm, or produced in similar amounts from both of them (Chiang et al., 2010). The former designations of miRNA and miRNA* referred to predominant and minor miRNAs. These designations are currently being replaced by the miRNA-3p and miRNA-5p designations according to the hairpin arm from which miRNAs arise.

MiRNomes (i.e. populations of miRNAs in samples) are relatively complex even though they are produced from a limited gene set. In addition to a complexity resulting from the maturation of miRNAs from both hairpin arms, miRNomes display a complexity resulting from the fact that different isomiRs (i.e. miRNAs differing by a few bases at their 3' and/or 5' ends) are produced (see Fig. 1). Whether isomiRs differing at their 3' ends differently regulate gene expression is still not known. These isomiRs should however target the same mRNA set as the prime determinant for mRNA targeting is defined by miRNA nucleotides 2-9. This so-called seed sequence targets complementary sequences in mRNAs, usually in 3' untranslated regions. In contrast, isomiRs differing at their 5' ends should target different mRNA sets as their seed sequences differ. Although the miRNA-3p and miRNA-5p designation takes into account the former source of miRNA complexity, it does not provide any indication on isomiRs. Those are most often treated as one miRNA in the literature.

Because of the tiny size of miRNA seed sequences, and thereby of the high frequencies of complementary sequences, one miRNA can potentially target hundreds to thousands of mRNAs. Based on seed sequences and other biophysical parameters, several algorithms have been developed to establish lists of putative mRNA targets (Veinar et al., 2013). Search for miRNA effective control in high-throughput proteomic experiments showed that approximately half of the putative targets are effective targets (Baek et al., 2008). Thus, each miRNA may modulate the expression of a very large set of genes.

MiRNA expression profiling using Illumina sequencing technology

Two different high-throughput technologies are currently used to establish miRNA expression profiling. Whatever the technology, one has to keep in mind that miRNA expression in miRNA profiles may not reflect miRNA abundance in samples. This is because hybridization efficiencies in the case of microarray technologies, and ligation efficiencies in the case of sequencing technologies, vary between miRNAs. This has for consequence that comparisons between miRNA expression profiles must only be performed between profiles that have been established with the same experimental protocol.

Microarray technologies that are based on hybridization are limited by the facts that only probe-related outputs can be monitored, cross-reactions produce false-positives and isomiRs are not individually analyzed. In contrast, sequencing technologies and their RNA-seq application escape these pitfalls. Illumina technologies currently generate hundreds of millions of reads of 50-100 bases per flow cell lane and is a technology of choice for the investigation of miRNA expression. Illumina technologies are available on platforms developed either by private companies or academic research centers.

Illumina sequencing technology requires cDNA library construction. This involves four steps: ligation of a DNA oligonucleotide (3' adaptor) to the 3' end of RNAs, ligation of a RNA or chimerical DNA/RNA oligonucleotide (5' adaptor) to the 5' end of RNAs, reverse transcription (RT) of the resulting molecules and cDNA production by polymerase chain reactions (PCR).

Different miRNAs are ligated to a given adaptor with different efficiencies (Hafner *et al.*, 2011). Although miRNAs that have been shown to mediate mRNA target suppression are abundant in most cases (Yang *et al.* 2011), one has to keep interest into miRNAs of moderate or low expression within profiles. Indeed, the number of molecules required to trigger a biological effect is not established and probably varies between miRNAs (Garcia *et al.*, 2011). Furthermore, differences in ligation efficiency between miRNAs imply that miRNAs of low expression into profiles may identify miRNAs of moderate or high abundance in biological samples. Finally, miRNAs are ligated to adaptors of unrelated sequences with efficiencies that vary by factors >10 (L.A. & A.B.T., unpublished data) Comparisons between miRNA expression profiles must therefore only be performed between profiles that have been established with the same adaptors.

Multiplex sequencing strategies

Sequencing prices by base are relatively low but sequencing prices by lane are too high for most laboratories to allow a large number of profiles to be analyzed on a basis of one profile per lane. On the other hand, miRNA expression profiles are largely outlined by 1-10 millions of miRNA reads. Therefore the hundreds of millions of reads obtained from a single Illumina sequencing lane enable multiplex sequencing strategies where tagged cDNA libraries are co-sequenced in a single lane.

Tagging strategies however are potential sources of artefactual expression variation that can limit the identification of differences between miRNA profiles and hence the benefit of multiplexing. Early tagging ‘by-ligation’ strategies that are still in use introduce barcodes through 3’ adaptors that only differ by a few bases (Hafner *et al.*, 2012). Different barcoded 3’ adaptors produce related, but different, miRNA profiles (Van Nieuwerburgh *et al.*, 2011). Detailed quantification of expression differences between miRNA profiles obtained from cDNA libraries constructed using one RNA sample of rat arcuate nuclei (ARC) and a set of barcoded 3’ adaptors shows that ‘by-ligation’ tagging strategies are mainly compatible with quantification of > 4-5 fold-changes in miRNA expression (L.A. & A.B.T., unpublished data).

Tagging ‘by-amplification’ strategies that have recently been developed by Illumina and others introduce barcodes through long amplification primers. These strategies can accurately quantify fold-changes in expression as low as 1.5 over at least three orders of magnitude (Van Nieuwerburgh *et al.*, 2011). Detailed analysis of expression differences between miRNA profiles obtained from cDNA libraries constructed using one RNA sample of rat ARCs and a set of barcoded primers shows that quantification threshold has nevertheless to be adjusted for a few miRNAs displaying high ranks in miRNA profiles and artefactual expression variation of $\cong 2$ (L.A. & A.B.T., unpublished data). This has to be taken into consideration when comparing miRNA expression profiles of one tissue under different physiological conditions as subtle rather than drastic expression changes are expected.

In our hands, long amplification primers have low, or even no, efficiency in cDNA library construction when working with low RNA amounts (see Supplemental Data). Amplification through primers displaying looped-out nucleotides with 3’ adaptors allows to combine advantages of ‘by ligation’ and ‘by amplification’ strategies, i.e. high cDNA

production and low artefactual expression variations in microRNA profiles (L.A. & A.B.T., unpublished data).

Finally, whatever the tagging strategy, expression efficiency factors can be calculated for each miRNA and for each barcoded adaptor or primer for accurate comparison of miRNA profiles (Amar *et al.*, 2012).

MiRNA expression profiles of rat hypothalamic ARCs

The hypothalamus is a complex brain structure. Specialized hypothalamic areas or nuclei can be sampled through laser capture microdissection. They are however large enough to be sampled by manual dissection and we have developed a protocol allowing to establish reliable miRNA expression profiles from hypothalamic nuclei of single rats following an Illumina-like protocol with a convenient cost (see Supplemental data).

The arcuate nucleus (ARC) senses whole body metabolic and endocrine changes and regulates energy homeostasis. Comparison of miRNA expression profiles of ARCs of rats under different physiological/pathological conditions would be helpful in deciphering the corresponding controls. Here we present new data aimed first at characterizing putative inter-individual variations of miRNA expression in ARCs of male Wistar rats housed under standard laboratory conditions.

The seven miRNA expression profiles C75_1-7 are highly similar. However, amongst the 100 most highly expressed miRNAs that account for >97% of the reads, two miRNAs of moderate expression, miR-182-5p and miR-183-5p, exhibit apparent larger expression changes than the other miRNAs (Fig. 2A). Quantification of the expression of miR-182-5p or miR-183-5p relatively to that of miR-127-3p that displays no change indicates an expression variation >150 between profiles. RT-qPCRs performed in duplicate with the Taqman technology confirm high expression variation of miR-182-5p and miR-183-5p between the seven ARC profiles ($R^2=0,98$) (Fig. 2B).

The characterization of differences in miR-182-5p and miR-183-5p expression between individuals illustrates the advantage of using high-throughput sequencing technologies to characterise miRNA expression in individual rather than in mixed samples. These differences should be of epigenetic origin due to the long inbreeding history of the Wistar strain. Finally we note that expressions of miR-182-5p and miR-183-5p co-vary between

the seven ARC profiles ($R^2 > 0.75$), probably as a consequence of the tight physical linkage of the miR-182 and miR-183 genes that map 10kb apart one from the other, and of the fact that both miRNAs and their related hairpins mature from the same long RNA precursor (Lumayag *et al.*, 2013). Further investigation of coding transcriptomes or proteomes is required to analyse consequences of the large difference in expression of miR-182 and miR-183-5p between ARCs.

CONCLUSION

R. norvegicus is currently being used for the study of a wide range of physiological phenotypes. The characterization of miRNomes of individual brain sub-structures from single rats will be of great help to explore the underlying molecular processes and disease mechanisms. Combined power of Illumina technology and multiplex sequencing allow a high number of samples and/or physiological conditions to be analyzed by many laboratories.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing platform of Imagif (Centre de Recherches de Gif sur Yvette) and been supported by le Centre de la Recherche Scientifique (CNRS), l'Université Paris-Sud, 11, and a grant from Danone/FRM2011. XB benefits from a grant of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

REFERENCES

- Amar L, Benoit C, Beaumont G, Vacher CM, Crepin D, Taouis M & Baroin-Tourancheau A (2012). MicroRNA expression profiling in hypothalamic arcuate and paraventricular nuclei from single rats using Illumina sequencing technology. *J. Neurosciences Meth.* 209, 134-143.
- Anders S & Huber W (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11(10), R106.
- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP & Bartel DP (2008). The impact of microRNAs on protein input. *Nature* 455(7209), 64-71.
- Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Belloch R, Schroth GP, Nusbaum C & Bartel DP (2010). Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev.* 24, 992-1009.
- Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A & Bartel DP (2011). Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of *Isy-6* and other microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 18,1036-1042.
- Hafner M, Renwick N, Brown M, Mihailović A, Holoch D, Lin C, Pena JT, Nusbaum JD, Morozov P, Ludwig J, Ojo T, Luo S, Schroth G, Tuschl T. RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA* 2011; 17:1697-712.
- Hafner M, Renwick N, Farazi TA, Mihailović A, Pena JT & Tuschl T (2012). Barcoded cDNA library preparation for small RNA profiling by next-generation sequencing. *Methods* 58(2),164-70
- He M, Liu Y, Wang X, Zhang MQ, Hannon GJ & Huang ZJ (2012). Cell-type-based analysis of microRNA profiles in the mouse brain. *Neuron* 73(1), 35-48.
- Kozomara A & Griffiths-Jones S (2011). miRBase integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 39, D152-D157.
- Linsen S, Krichevsky EV, de Wit E, de Bruijn E & Cuppen E (2010). Small RNA expression and strain specificity in the rat. *BMC Genomics* 11, 249-260.
- Lumayag S, Haldin CE, Corbett NJ, Wahlin KJ, Cowan C, Turturro S, Larsen PE, Kovacs B, Witmer PD, Valle D, Zack DJ, Nicholson DA & Xu S (2013). Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(6), E507-16.
- Paxinos G, Watson C (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: The New Conal Set - 161 Diagrams*. Fifth edition. Elsevier Academic Press.
- Vejnar CE, Blum M & Zdobnov EM (2013). miRmap web: comprehensive microRNA target prediction online. *Nucleic Acids Res.* (Web Server issue), W165-8.

Van Nieuwerburgh F, Soetaert S, Podshivalova K, Ay-Lin Wang E, Schaffer L, Deforce D, Salomon DR, Head SR & Ordoukhanian P (2011). Quantitative bias in Illumina TruSeq and a novel Post Amplification barcoding strategy for multiplexed DNA and small RNA deep sequencing. PLoS one 6, e26969.

Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC & Lai EC (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. RNA 17, 312-26.

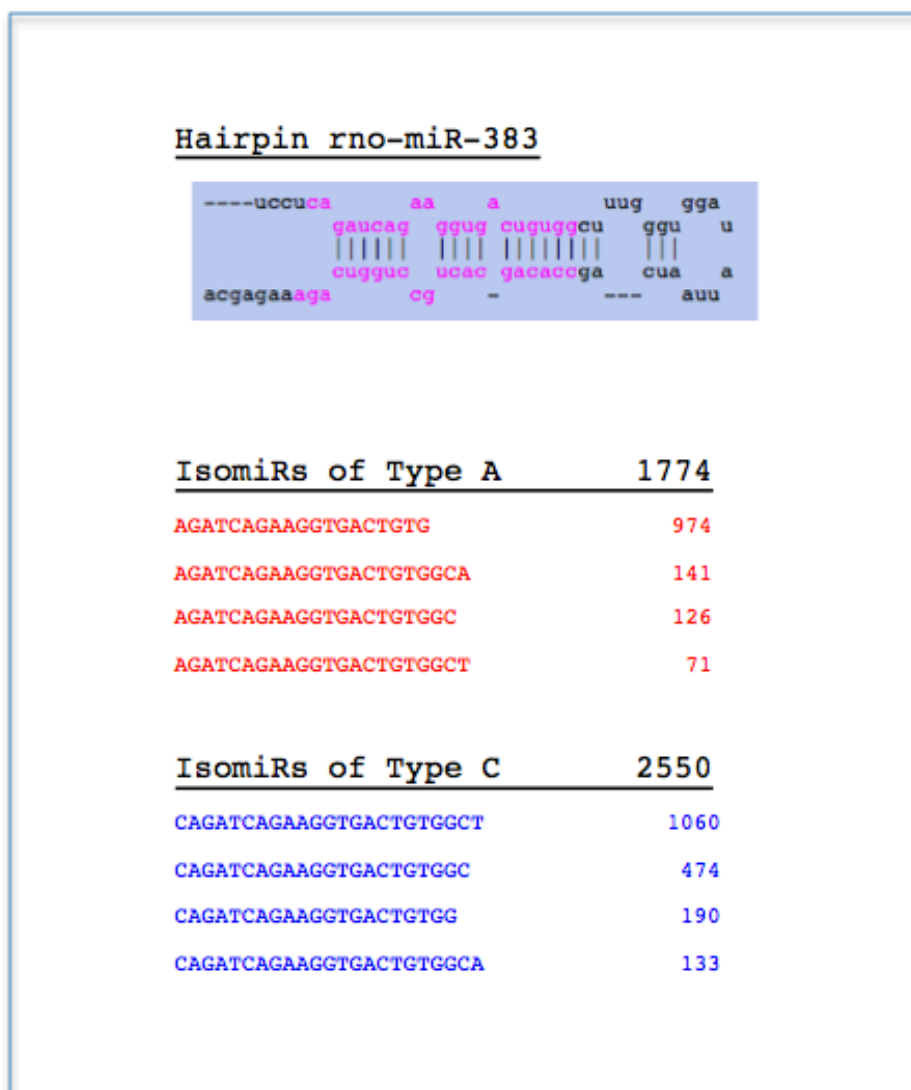


Figure 1: Rno-miR-383 IsomiRs.

The rno-miR-383 hairpin has been taken from the miRbase database (<http://www.mirbase.org>). The corresponding duplex of ≈ 22 bases is showed in pink. The rno-miR-383 hairpin produces two families of miRNAs differing by one base at their 5' ends from its 5' arm. These two families, here named IsomiRs of types A or C depending on their first base, are produced in similar proportions as indicated by their occurrences of 1774 and 2550 observed in one of the seven ARC profiles, respectively. Both families harbor several isomiRs differing by one or a few bases at their 3' ends, the four most abundant of which are shown with their respective occurrences in this ARC profile. The rno-miR-383 hairpin does not produce any miRNA from its 3' arm.

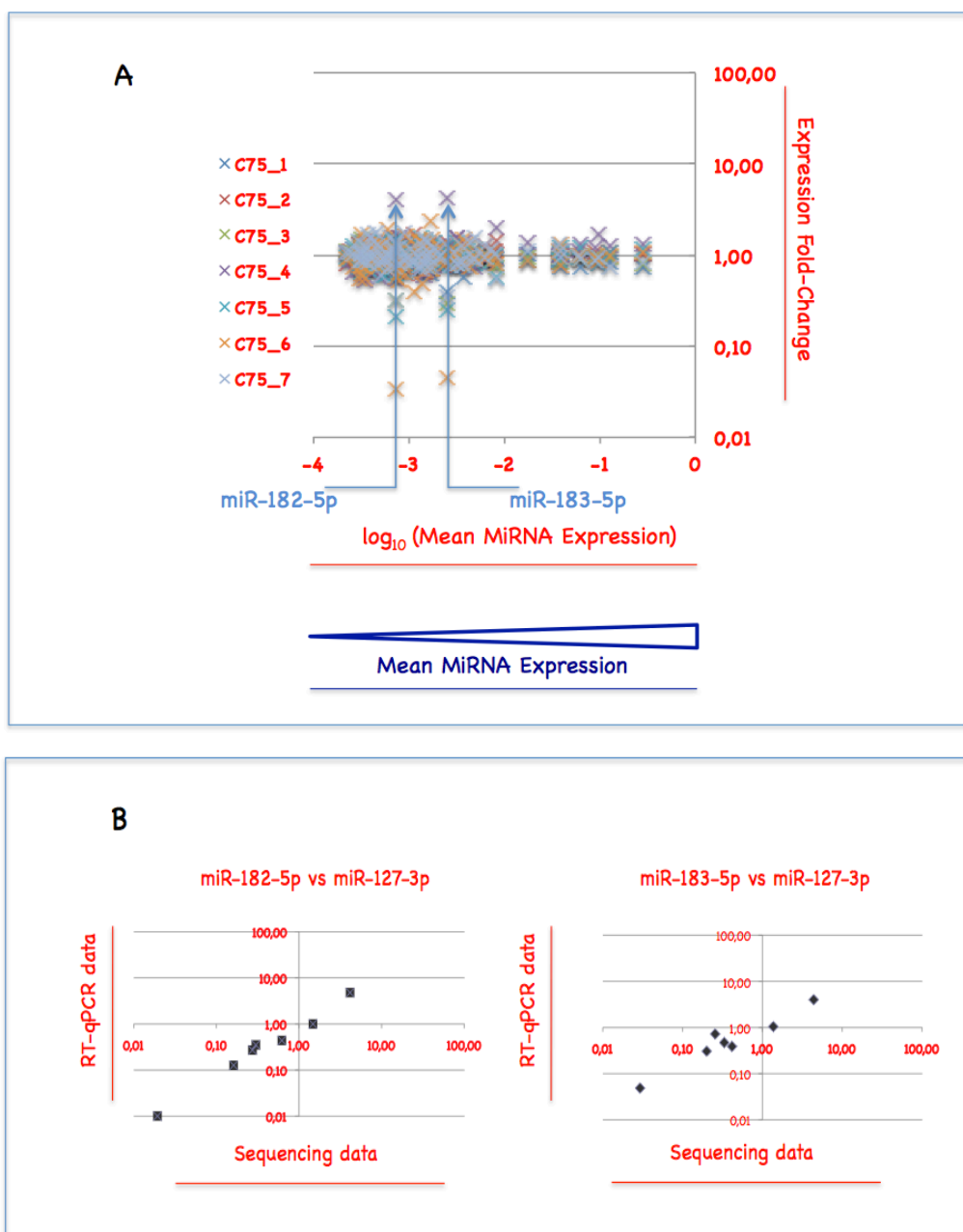


Figure 2 : miRNA expression in ARCs.

(A) MiRNA expression profiles. For each miRNA, relative expressions in profiles C75_1-7 are compared by dividing the C75_1-7 values by the mean value. The data are presented in a plot in which the x-axis = \log_{10} (mean miRNA expression) and the y-axis = miRNA relative expression in C75_1-7 drawn with a \log_{10} scale. Out of the 100 miRNAs with expression >0,01% ($\log_{10}>-4$), two miRNAs, miR-182-5p and miR-183-5p, noticeably display variable expression. **(B)** relative expressions of miR-182-5p or miR-183-5p relatively to that of miR-127-3p. In each profile, expressions of miR-182-5p or miR-183-5p are quantified relatively to that of miR-127-3p by using sequencing or RT-qPCR technologies. Relative expressions between profiles are compared by dividing the C75_1-7 values by the mean value. Quantifications of miR-182-5p or miR-183-5p relatively to that of miR-127-3p by sequencing or RT-qPCR technologies display high correlations.

ETUDE II

Article sous presse dans la revue Scientific Reports

NB : Du fait de leur longueur, les tables supplémentaires ne sont pas incorporées dans ce manuscrit. Elles seront disponibles incessamment sur le site du journal - Soraya Doubi-Kadmiri, Charlotte Benoit, Xavier Benigni, Guillaume Beaumont, Claire-Marie Vacher, Mohammed Taouis, Anne Baroin-Tourancheau and Laurence Amar. (sous presse). Substantial and robust changes in microrna transcriptome support postnatal development of the hypothalamus in rat.

DES CHANGEMENTS NOMBREUX ET ROBUSTES D'EXPRESSION DES MICROARN ACCOMPAGNENT LA MATURATION HYPOTHALAMIQUE CHEZ LE RAT

Avant d'étudier l'impact d'un régime maternel hyperlipidique sur la programmation de l'expression des miARN dans l'ARC de la descendance adulte, nous avons étudié l'impact direct d'un tel régime sur l'expression des miARN de l'ARC/EM au cours de la période post-natale précoce.

Nous avons soumis des mères Wistar à un régime de type gestationnel C (18%, 23% et 59% de l'apport énergétique provenant respectivement des lipides, protéines et carbohydrates, régime C, mères C, descendants C) ou un régime hyperlipidique (46%, 16% et 38% de l'apport énergétique provenant respectivement des lipides, protéines et carbohydrates, régime HF, mères HF, descendants HF) durant les périodes de gestation et lactation (voir page 119).

A la naissance, les descendances présentent le même poids corporel. Cependant la croissance des descendances HF est ralentie dès le stade P4. A P28, leur déficit pondéral s'élève à 30%. La cinétique de leptinémie plasmatique des descendances HF entre P4 et P28 est très différente de celle des descendances C bien que les leptinémies plasmatiques des mères C et HF soient semblables. Aux stades P8 et P14 le niveau de leptine est de 2 à 3 fois inférieur. Notre régime HF a un effet notable sur la cinétique de croissance pondérale et de leptinémie durant la période post-natale.

Nous avons caractérisé l'expression des miARN chez la descendance aux cinq stades développementaux, P4, P8, P14, P21 et P28. Pour des raisons de coût, nous avons restreint notre analyse à la descendance mâle. Nous avons appliqué le schéma expérimental décrit dans l'étude I : 5 à 7 animaux par descendance, dissection de l'ARC/EM, purification des ARN, construction des banques, analyse bio-informatique des données de séquençage, construction des profils d'expression individuels, analyse statistique des différences d'expression et validation par RT-qPCR des expressions. Nous avons caractérisé l'expression de plus de 500 miARN.

Nous avons tout d'abord établi la cinétique d'expression des miARN de la descendance C entre P4 et P28. Comparés aux profils P28 pris comme profils de référence, les profils

d'expression P4, P8, P14 et P21 présentent 18 à 47% de différences. Ces résultats mettent en avant l'importance insoupçonnée des modifications d'expression de gènes de miARN dans l'ARC/EM de rat durant les 4 premières semaines post-natales.

Nous avons ensuite comparé les profils d'expression entre stades consécutifs. Les profils P4 et P8 sont relativement similaires, il ne présentent que 6% de différences de même que les profils d'expression P14 et P21. Au contraire, les profils P8 et P14 montrent jusqu'à 15% de différences, et les profils P21 et P28 jusqu'à 29%. Ces résultats démontrent la plasticité d'expression de miARN durant les deuxièmes et troisièmes semaines post-natales, période de mise en place des circuits neuronaux hypothalamiques.

L'identification de différences d'expression est d'autant plus importante que l'homogénéité des profils entre répliques est forte. Nous avons donc pris le soin d'étudier et comparer l'homogénéité des répliques à chacun des stades de développement. Les différences quantitatives d'expression que nous avons mises en évidence ne sont pas liées à des différences d'homogénéité des stades mais à une réelle cinétique.

Nous avons enfin comparé les profils d'expression de miARN entre descendance C et HF à P4, P8, P14, P21 et P28. Les profils HF et C sont relativement similaires avec moins de 3% de différence de P4 à P21. A P28 elles atteignent 7%. Bien que les descendance C et HF montrent de grandes différences de croissance et de leptinémie plasmatique, les profils d'expression de miARN sont relativement similaires entre P4 et P28.

En conclusion, nous avons identifié une grande plasticité d'expression des miARN de l'ARC/EM au cours des trois premières semaines post-natales. Jusqu'à 30% des miARN sont différenciellement exprimés. Nous avons également montré la relative robustesse des profils d'expression au cours de cette période chez des descendance soumises à un environnement induisant un retard de croissance et un bas niveau de leptinémie.

**SUBSTANTIAL AND ROBUST CHANGES IN MICRORNA
TRANSCRIPTOME SUPPORT POSTNATAL DEVELOPMENT
OF THE HYPOTHALAMUS IN RAT**

Soraya Doubi-Kadmiri^{1#}, Charlotte Benoit^{1,2#}, Xavier Benigni^{1,3}, Guillaume Beaumont^{1,4},
Claire-Marie Vacher¹, Mohammed Taouis¹, Anne Baroin-Tourancheau¹ and Laurence
Amar^{1*}

¹ Université Paris-Saclay, Université Paris-Sud, CNRS, UMR 9197-Institut de
Neurosciences Paris-Saclay, Orsay F-91405, France

² Present address : Nodea medical, 1 mail du Professeur Georges Mathé, Villejuif F-94800,
France

³ Present address : Institute of Plant Sciences - Paris-Saclay, 2 Rue Gaston Crémieux, Evry
F-91000, France

⁴ Present address : Laboratoire de Bioinformatique, Centre National de Génotypage,
Commissariat à l'Énergie Atomique, 2 rue Gaston Crémieux, CP5721, Evry F-91057,
France

These authors contributed equally to this work

* Corresponding author : laurence.amar@u-psud.fr

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) modulate gene expression in male germ cells and somatic tissues of mammals on a genome-wide scale. Hundreds of miRNAs are encoded by mammalian genomes, a large fraction of which is expressed in brain. Here we have investigated the complexity and dynamics of miRNA transcriptomes that associate with neuronal network maturation of hypothalamic arcuate nucleus and median eminence (ARC/ME) in rat by analysing more than 300 miRNAs from 3-7 biological replicates at 5 postnatal time-points. The network connecting ARC/ME to other hypothalamic and extra-hypothalamic regions matures in an environment-dependent manner. We therefore analyzed miRNA transcriptomes of progeny of dams fed either a balanced or unbalanced diet during gestation and lactation. More than 30% of the miRNAs displayed significant changes of expression between stages P8 and P14, and P21 and P28; half of the changes were greater than 3-fold. Among those miRNAs were well-known and dozens of still poorly documented miRNAs. Progeny of dams fed an unbalanced diet displayed a severe growth retardation phenotype, lower levels of plasma leptin but almost identical miRNA transcriptomes. Together these data demonstrate that two substantial and robust changes in miRNA transcriptome of ARC/ME occur at a period crucial for neuronal network functional organization.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are RNA molecules of 20-24 bases that post-transcriptionally control the expression of protein-coding genes throughout interactions with complementary bases of target messenger RNAs (mRNAs). As a result, translation efficiency and/or stability of mRNAs are decreased and the levels of the corresponding proteins are diminished^{1,2}.

Mammalian genomes harbor several hundreds of miRNA-encoding genes (miR genes) whose expression is essential during spermatogenesis and in somatic tissues of the post-implantation embryo and adult. Based on well-characterized interactions between miRNAs and target mRNAs involving base positions 2-8 (seed regions) in the former and complementary sequences within 3'UTRs of the latter, several algorithms have been developed for target prediction. Because of the short size of the predicted miRNA:mRNA heteroduplex and large amounts of sequences in mRNA transcriptomes, bioinformatics analyses predict that miRNAs modulate gene expression on a genome-wide scale, each miRNA controlling the expression of several hundreds of protein-coding genes. Bioinformatics analyses also predict that expression of most protein-coding genes are controlled by miRNA combinations. Therefore miRNA transcriptomes rather than single miRNA expressions should be investigated to provide full information on the control of gene expression.

Brain harbors complex miRNA transcriptomes, complete information of which can be recovered by high-throughput sequencing (HTS) technologies that provide digital data and unambiguous identification of miRNAs. miRNA transcriptome complexity (i.e. the multiplicity of miRNA sequences in miRNA transcriptomes) in brain comes in part from the large number of miR genes that are expressed³. Complexity of miRNA transcriptomes is also due to the fact that miRNAs do not mature as single products of miR genes but as multiple products differing by one or a few bases at their ends (isomiRs). 3'-isomiRs (miRNAs with different 3'ends) should target identical sets of mRNAs. Whether 3'-isomiRs display identical targeting efficiencies and/or half-life times is under investigation. In contrast, 5'-isomirs (miRNAs with different 5'ends) that display different seed regions are expected to target different mRNA sets. Unambiguous identification of 3'- and 5'-isomiRs is therefore a challenge for miRNA research and research on the control of gene expression. Unambiguous identification of related miRNAs produced by miR multigene

families is also a challenge. Such miRNAs that differ by one or a few bases at internal positions, downstream of the seed region, can target different mRNA sets⁴. Besides providing unambiguously identification of isomiRs and related miRNAs, HTS technologies have the advantage of producing hundreds of millions of data at a (relatively) reasonable cost. This allows the study of high numbers of biological replicates and physiological conditions, thus the generation of data of statistical and biological significance.

The hypothalamic arcuate nucleus (ARC) harbors orexigenic Agouti-related peptide/Neuropeptide Y (AgRP/NPY) and anorexigenic pro-opiomelanocortin (POMC) neurons that communicate with second-order neurons located in a number of other hypothalamic as well as extra-hypothalamic regions to adjust food intake and energy expenditure to body needs. The ARC is located adjacent to the median eminence (ME) and 3rd ventricle. While the former is one of the few brain regions devoid of blood brain barrier and as such, especially sensitive to circulating signals, the latter conveys circulating signals through cerebrospinal fluid. Those features make ARC/ME a primary center for the sensing of nutrient and hormone variations, integration of input signals and regulation of the energy balance.

The formation of the complex neuronal circuitry connecting the ARC to other hypothalamic and extra-hypothalamic regions includes axonal growth and synaptic maturation. This occurs during the first three weeks of life in rodents⁵ and developing ARCs of mice and rats in the early postnatal period are widely used models. Leptin plays a critical role in the formation of the ARC neuronal circuitry. Projections from the ARC are two to four times fewer in leptin-deficient Lepob/Lepob adult mice relatively to Lep+/Lep+ adult mice⁶, and in adult rats of Diet Induced Obesity strains compared to adult rats of Diet Resistant strains⁷. Projections from the ARC can be partly restored in Lepob/Lepob adult mice by leptin administration during the maturation period⁶. Several studies have showed that the maternal diet and metabolic perinatal environment play critical roles in the formation of the ARC neuronal circuitry. Maternal high-fat diet during lactation impairs the ARC circuitry in mice⁸ while maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal plasma leptin and affects the development of the ARC neuronal network in rats⁹. In mice as in rats, defects in the ARC neuronal circuitry correlate with Type 2 diabetes and/or obesity. Maternal unbalanced diet has also been shown to impact the organization of astrocytes in ARCs of young progeny¹⁰.

miRNA maturation depends upon the DICER endoribonuclease. Conditional deletions of Dicer in POMC-expressing cells result in a POMC neuron degenerative process that starts around 3 weeks of age, as well as defective glucose metabolism, obesity and alterations in the pituitary-adrenal axis in adult mice^{11, 12, 13}. Degeneration of POMC-expressing cells establishes that miRNAs are key players for functional ARCs in neonates and adults.

Our work aimed to test two hypotheses. First, ARC/ME development and neuronal network maturation associate with substantial changes in miRNA populations. Second, these changes are largely influenced by the quality of the developmental environment. In studying more than 300 miRNAs in rat, we showed that the first hypothesis was true, while the second was not verified in our experimental conditions. Our data demonstrate that substantial and robust changes in miRNA transcriptome support the development of the hypothalamus during a period of high remodelling of the neuronal circuitry and provide a sound framework for further investigation of combined changes in miRNA and target mRNA expression.

RESULTS

Complex miRNA transcriptomes characterize the hypothalamic ARC/ME between stages P4 and P28

In order to look for changes in miRNA transcriptome of ARC/ME in the period of axonal growth and synaptic maturation, we have first dissected the corresponding area of 6-7 male Wistar rat progeny of dams fed a balanced diet at postnatal stages P4, P8, P14, P21 or P28. Total RNAs have been extracted, treated with DNase or used to purify small RNAs of 18-36 bases. At each stage, progeny were obtained from three different litters in order to limit breeding and/or housing bias.

ARC harbors a neuronal population highly producing POMC transcripts. To characterize ARC/MEs, we determined the level of POMC transcripts relatively to that of ubiquitous GAPDH transcripts using DNA-free RNAs and RT-qPCRs (Supplemental Fig. S1A and corresponding legend). On the basis of their relative expression compared to that of hypothalamic paraventricular nuclei (PVN) taken as POMC-non-expressing controls, 3 ARC/MEs of stage P4 and 1 of stage P8 were discarded from our analysis. One ARC/ME of stage P28 which value was much lower than the other values of the same stage was also discarded. Four, 6, 6, 7 and 6 ARC/MEs were respectively conserved for further analysis of miRNA transcriptomes at stages P4, P8, P14, P21 and P28, respectively.

For each ARC/ME, an individual cDNA library was built using small RNAs and an Illumina-like protocol. Individual miRNA expression profiles were constructed from 1.4 +/- 0.3 millions of reads mapping to known miR genes (Supplemental Table S1A).

495 miR genes are listed for the rat genome in the miRBase database release 21, potentially encoding ~2000 miRNAs (see Materials and Methods). Individual profiles of miRNA expression were used to build mean expression profiles in which more than 550 miRNAs were identified by more than 10 reads at, at least, one stage (Supplemental Table S2). Only those miRNAs were considered in our analyses. The choice of this limit was based on the fact that miRNAs of low expression in profiles built from tissues such as ARC/ME with several cell types can identify miRNAs of high abundance within one cell type. miRNAs of low expression in profiles can also identify miRNAs of moderate or high

abundance in tissues as a consequence of a biased representation in cDNA libraries¹⁴. Note that biased representation is reproducible between cDNA libraries and has therefore no impact on analyses of miRNA differential expression.

Differences of homogeneity in miRNA transcriptome across biological replicates indicate high dynamics of miRNA expression at stages P14 and P21

We first determined the level of homogeneity of miRNA expression at each stage by comparing miRNA expressions profiles of biological replicates to their corresponding mean profiles (Fig.1A). Levels of homogeneity were quantified at each stage by computing the coefficients of variation of expression (ratios of the standard deviation to the mean) either over all miRNAs (global CVs) or over sliding windows of 50 miRNAs of decreasing abundance (sliding CVs) (see Fig.1A & Supplemental Fig. S2A).

Stages P8 and P28 displayed similar global CVs (mean \pm SEM = 0.32-0.33 \pm 0.01) and sliding CVs (ranging from 0.22 to 0.48). In contrast, stages P4, P14 and P21 displayed high global CVs (0.48-0.55 \pm 0.01) and sliding CVs. Stage P14 clearly enclosed a sub-stage P14.4 of four biological replicates which were characterized by much lower global CV (0.28 \pm 0.01) and sliding CVs ranging from 0.20 to 0.39 (Fig. 1B and Supplemental Fig. S2B). Stage P21 also clearly enclosed a sub-stage P21.4 of four biological replicates of low global CV (0.27 \pm 0.01) and sliding CVs (from 0.18 to 0.35). Sub-stages P14.4 and 21.4 were not litter-dependent.

Together, low homogeneity of miRNA expression across biological replicates at stages P14 and P21 and litter-independency of homogeneous expression at substages P14.4 and 21.4 suggested that a high dynamics of miRNA population takes place in the hypothalamic ARC/ME during a period of peaks of axon growth and synapse formation. Stages P14.4 and 21.4 were used in further analyses.

miRNA transcriptomes display substantial change(s) between stages P8 and P28

We then compared miRNA expressions at stage P28 with miRNA expressions at stages P4, P8, P14.4 or P21.4 (Fig. 2A). p-values were corrected for false discovery rates and padj-values <0.05 were retained as significant (see Materials and Methods). Depending on the comparison, 39-178 miRNAs (8%-43%) exhibited expression changes and 22-99 of

changes (5%-22%) were higher than 3 (higher than 3.0 in cases of up-regulation and lower than 0.33 in cases of down-regulation).

Our experimental scheme involved the sequencing of several replicates at each developmental stage or sub-stage to provide miRNA expression data of statistical significance. We also performed RT-qPCRs on the same RNA samples to validate sequencing data. Given the number of miRNAs and the limited quantity of material in individual ARC/MEs, we selected six miRNAs: miR-124a-3p which is widely expressed throughout brain¹⁵, miR-29a/b-3p whose brain-specific knockdown results in neuronal cell death^{16, 17}, miR-7a-5p and miR-137-3p which are expressed in hypothalamic nuclei including ARC¹⁸, miR-24-3p and miR-1843-5p which are still poorly or not clearly documented. As the U6 snRNA was excluded from small RNA fractions and could not be used as an internal reference to quantify miRNA expressions, we quantified the expression of miR-7a-5p, miR-24-3p, miR-29-3p, miR-137-3p and miR-1843-5p relatively to that of miR-124-3p, at P4, P8, P14.4 and P21.4 relatively to P28, from RT-qPCR amplification or sequencing data (Fig. 3A). Out of the 20 comparisons, RT-qPCR amplification and sequencing data gave similar information except in the two cases of miR-24-3p at stage P8 and stage P14.

Together these data demonstrate that substantial changes in the miRNA transcriptome of ARC/ME occur during the first four postnatal weeks. The exhaustive list of miRNA expression comparisons is presented in Supplemental Table S3.

miRNA transcriptomes of ARC/ME display at least two substantial changes between stages P8 to P28

To characterize the kinetics of changes in miRNA transcriptome of ARC/ME between stages P4 and P28, pairs of side-stages were compared (Fig. 2B). Stages P4 and P8 displayed different but similar miRNA transcriptomes. 9 miRNAs (2%) were differentially expressed; 1 miRNA (0.2%), miR-344g-hairp had expression differences higher than 3. In contrast, major changes support the transition between stages P8 and P14.4. In that case, 177 miRNAs (37%) were differentially expressed and 107 miRNAs (23%) had expression differences higher than 3. Changes in miRNA transcriptome also occurred between stages P14.4 and P21.4. Ninety miRNAs (15%) were differentially expressed, 41 (8%) had expression differences higher than 3. Finally, widespread changes in miRNA transcriptome

supported the transition between stages P21.4 and P28 : 151 miRNAs (32%) were differentially expressed among which 70 (15%) had expression differences higher than 3.

Altogether these results demonstrated that at least two substantial changes in miRNA transcriptome support ARC/ME maturation. In most cases, related miRNAs that are produced from multigenic families displayed coordinated regulations. The exhaustive list of miRNA expression comparisons between side-stages is presented in Supplemental Table S4.

miRNA transcriptomes highly similar in ARC/ME of progeny with impaired body growth and plasma leptin

We also examined the impact of postnatal growth retardation on the miRNA transcriptome of developing ARC/ME by studying male Wistar progeny of dams fed an unbalanced maternal diet (16% of protein, 38% of carbohydrates and 46% of lipid-derived energy intake) during the gestation and lactation periods (HF-dams). Progeny from HF-dams (HF-progeny) were obtained at the same time than progeny of dams fed a standard balanced diet that we studied first (thereafter named C-progeny and C-dams, respectively). As for C-progeny, 6-7 male HF-progeny were obtained from three different litters at postnatal stages P4, P8, P14, P21 or P28.

From stage P4, HF-progeny displayed severe body growth retardation when compared to C- progeny ($p < 0.01$) (Fig. 4A). Growth retardation rose up to 30% at stage P28 ($p < 0.001$). HF-progeny also displayed severe variation of plasma leptin with a decrease by a factor of 2-3 at stages P8 and P14 and an increase by a factor of 1.5-2 at stages P4 and P28 when compared to C-progeny ($p < 0.01$ in all cases). The level of plasma leptin was similar between C- and HF-dams (Supplemental Fig. S3).

ARC/MEs were dissected. Total RNAs were extracted, treated with DNase, or used to purify small RNAs of 18-36 bases as above. Upon analyses of POMC transcripts relatively to that of GAPDH transcripts, 2 ARC/MEs of stage P4 and 3 of stage P14 were discarded from our analysis (Supplemental Fig. S1B). Three, 7, 4, 7 and 7 ARC/MEs were conserved for further analysis of miRNA transcriptomes at stages P4, P8, P14, P21 and P28, respectively.

cDNA libraries were constructed and miRNA expression profiles of ARC/MEs of HF-progeny were analyzed (Supplemental Fig. S4 & S5, Supplemental Tables S1B & S5). miRNA expression homogeneities across biological replicates were similar in HF- and C-progeny at stages P8, P21 and P28 (Fig.4C). Stages P4 and P14 were characterized by lower global CVs (0.24-0.25 +/- 0.01) and sliding CVs. miRNA expressions were then compared between C- and HF-progeny (Fig.5, Supplemental Table S6). From P4 to P28, miRNAs displayed very similar expression between both progeny: 0-22 (<5%) miRNAs displayed differential expression and 0-7 of them (<2%) had expression differences higher than 3. Ratios of miR-7a-5p, miR-24-3p, miR-29-3p, miR-137-3p or miR-1843-5p expressions relatively to miR-124-3p expression calculated from RT-qPCR at P28 data matched those calculated from HTS data (Fig. 3B).

Despite large differences in postnatal growth and plasma leptin kinetics, miRNA transcriptomes were highly similar from P4 to P28 between C- and HF-progeny.

DISCUSSION

Our work aimed to test the hypotheses that neuronal network maturation in hypothalamic ARC/ME associates with substantial changes in miRNA transcriptomes, and if true, that these changes could be influenced by metabolic environments. miRNAs post-transcriptionally control gene expression in mammals. In tissues like brain that express a large fraction of miR genes, combination of miRNAs rather than single miRNAs are expected to participate in these controls. Combined miRNAs may act synergically or in opposition. As miRNAs associate with Argonaute 2 (AGO2) proteins to form and direct RNA-induced silencing complex (RISC) to target RNAs, miRNAs may also compete for AGO2 proteins if populations of the former overload cellular concentrations of the latter.

Here we demonstrate using HTS and RT-qPCR technologies, dissected ARC/MEs and large numbers of biological replicates, that substantial changes in miRNA expression occur during the period of functional organization of the ARC/ME neuronal network. More than 30% of the miRNAs display significant expression changes first between stages P8 and P14, then between stages P21 and P28. Half of the changes are greater than 3-fold. The power of miRNAs to regulate mRNAs is expected to be proportional to their abundance. All miRNA expression changes might therefore impact mRNA stability and/or translation efficiency.

To our knowledge, few studies have looked at miRNA population changes during the period of functional organization of the neuronal network of the hypothalamic ARC. Zhang et al (2013)¹⁹ used a combined approach of NGS, microarray and RT-qPCR technologies to characterize the expression of 175 miRNAs in hypothalamus of pigs at P60, P120 and P180. Thirty-seven miRNAs, 13 of which are conserved among mammals, appeared differentially expressed between stages P60, P120 and/or P180. It is however unknown whether these stages encompass the period of neuronal network organization in ARC/ME. In consequence changes in miRNA expression profiles cannot be compared between the rat and pig models.

More recently, Topper et al. (2015)²⁰ used specific RT-qPCRs to characterize the expression of 8 miRNAs chosen for their abundance in hypothalamic profiles, importance in neurodevelopment, or sexual dimorphism, in the hypothalamic medial preoptic nucleus (MPN) and ventromedial nucleus (VMN) of male Wistar rats at postnatal stages P15, P30, P45 and P90. MPN is involved in osmoregulation, thermoregulation and in the control of

sleep homeostasis while VMN participates in the control of energy homeostasis. Let-7b, miR-124a and miR-9 displayed no expression differences in MPN between P15 and P30 while let-7a, miR-7, miR-132, miR-145 and miR-219 displayed up-regulations. In contrast, all the eight miRNAs displayed up-regulations in VMN between the two stages.

Our data established that miR-124, miR-145 and miR-219 are steadily expressed in ARC/ME between stages P4 to P28 (see Supplemental Table S4). Our data also identify an up-regulation of all members of the let-7 and miR-7 gene families between P14 and P28. Our data identify an up-regulation of let-7a, let-7b, miR-132 and miR-7 as well as the up-regulation of all members of the let-7 and miR-7 gene families between P14 and P28 and that of the four miRNAs encoded by the miR-132/212 cluster, i.e. miR-132-3p, miR-132-5p, miR-212-3p and miR-212-5p. miR-9 displayed a transient down-regulation at P21.

Altogether these studies strongly suggest that an up-regulation of most, if not all, members of the let-7 and miR-7 families and of the miR-132/212 cluster marks hypothalamus development while miR-9, miR-124a, miR-145 and miR-219 displayed nucleus-specific regulations of expression. By studying miRNA expression profiles at multiple and close time-points in the early postnatal period of rat, our study also demonstrate the expression of dozens of still poorly documented miRNAs, many of which are regulated at the time of ARC/ME development.

Maturation of ARC/ME neuronal network is controlled in part by leptin and maternal diet during the gestation and/or lactation periods. Maternal perinatal undernutrition in particular has been showed to drastically reduce postnatal leptin and affect the development of the ARC neuronal network in rats⁹. Here we have performed a comparison of miRNA transcriptomes in progeny of dams fed a balanced or unbalanced diet during gestation and lactation. HF-progeny started to display body growth retardation from P4 as well as a 2-3 fold decrease in plasma leptin at stages P8 and P14. Noteworthy, despite these large differences, miRNA transcriptomes appeared highly similar from stages P4 to P28 between C- and HF-progeny. Stage P28 displayed highest, also modest, differences with less than 5% of miRNAs being differentially expressed between both progeny and less than 2% showing expression differences higher than 3. Altogether these data show that retardation in postnatal growth and low plasma leptin levels do not associate with large differences in miRNA expression in ARC/ME during the period of neuronal network formation.

Together our data provide first demonstration for a robust dynamics of miRNA expression in maturing ARC/ME and highlight the importance of considering multiple miRNA expressions when analysing the regulation of gene expression during hypothalamic development and/or periods of neuronal network functional organization. Knowledge of miRNA transcriptome changes is important for deciphering gene expression regulation in maturing neuronal network and hypothalamic regions and our work provide a solid framework for further analyses of the impact of miRNA transcriptome changes on coding transcriptomes and proteomes.

METHODS

Animals

All animals were maintained under a 12/12 Light/Dark cycle (lights on at 8 a.m.) with stable temperature (22 ± 1 °C). Virgin females Wistar of 4 weeks and males Wistar of 8 weeks from CER Janvier, France, have been habituated to our facilities for 4 weeks before breeding. Standard balanced diet (18%, 23% and 59% of the energy content derived from lipids, proteins and carbohydrates, respectively, Safe, France) and water were provided ad libitum. From day 1 of pregnancy and until weaning, dams were either maintained on the standard diet or shifted to an unbalanced diet (46%, 16% and 38% of the energy content derived from lipids, proteins and carbohydrates, respectively, Safe, France). At birth, litters were sized to ten pups to prevent lactational under- or overnutrition. At postnatal stages P4, P8, P14, P21 or P28, between 9 a.m. and 10 a.m, three dams and their progeny were anesthetized with isoflurane. Body weights were measured before killing by decapitation. Brains were removed, frozen in isopentane maintained at -40°C and stored at -80°C. Bloods were collected in the presence of 50 ul/ml of 160 U/ml heparin. All procedures were conducted according to the guidelines of laboratory animal care and were approved by the local governmental commission for animal research: Ethic Committee for animal experimentation of Paris Center and South # 59 (France), with authorization # 91-467.

Leptin measurements

Leptin plasma levels were measured using Elisa according to the manufacturer's protocol (Millipore). 25 ul of plasma were used for each point.

ARC/ME dissection, RNA extraction and purification of short RNAs

The ARC/ME is ventrally adjacent to the 3rd ventricle. A 2-3 mm section was cut from progeny brains, 1 mm rostral to the optic chiasma and ARC/ME was punched with relation to the ventral part of the 3rd ventricle. ARC/ME-containing punches were named ARC/MEs. PVN is located dorsally and laterally to the 3rd ventricle. A 1 mm section was cut from adult brains immediately rostral to the optic chiasma and PVN was punched with relation to the dorsal part of the 3rd ventricle. PVN-containing punches, were named PVNs. ARC/MEs, and PVNs were stored individually in Ceramic Bead tubes (Ozyme) at -80 °C.

On purpose, ARC/ME- or PVN-containing Ceramic Bead tubes were added QIAzol lysis reagent (Qiagen) (700 μ l) and immediately homogenized using a PreCellys homogenizer (PreCellys 24/Cryolys) for 20s at room temperature. After addition of chloroform (150 μ l), homogenates were centrifuged 15 mn at 12,000 rpm to separate the organic and aqueous phases. The latter was recovered and nucleic acids, precipitated by adding one volume of isopropanol. Pellets were centrifuged, rinsed twice with ethanol 70% and resuspended in H₂O (20 μ l). The yield of total RNA was around 1-2 μ g.

Two-thirds of total RNAs were added an equal volume of formamide, heat at 70°C for 3 min and loaded on on a denaturing urea (8M) polyacrylamide (17%) gel for size-fractionation. In all samples, the high quality of RNAs was checked by a lack of any smear and the fact that the tRNAs, 5S RNA and 5.8S RNA migrated as discrete bands. Small RNAs of 18-36 bases were eluted from the corresponding slices by overnight incubation in NaCl 0.4M (0.8 ml) at 4°C under gentle shaking. Eluates were precipitated by adding 2.5 volumes of ethanol in the presence of glycogen (10 ng) and resuspended in H₂O (10 μ l).

One third of total RNAs were treated with 1 U of DNase RQ1 (Promega) in a volume of 50 μ l for 30 min according in the provided buffer, then phenol extracted, precipitated with ethanol in presence of NaOAc 0.3M, rinsed twice with ethanol 70% and resuspended in H₂O (10 μ l).

cDNA library construction

Individual cDNA libraries were built following an Illumina-like protocol in which 3'- and 5'-adapters were sequentially ligated at the 3' and 5' ends of small RNAs, respectively, to allow for reverse transcription (RT) and amplification by polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotides are listed in Supplemental Table S7. 3'-Adaptor (25 pmoles) was adenylated as described²¹ using 1600 U of T4 DNA ligase (NEB) and the Quick Ligation reaction buffer (NEB) in a volume of 50 μ l by overnight incubation at 37°C.

The Illumina-like protocol that we used displayed some modifications compared to the protocol previously described²². A first mix was made of small RNAs (5 μ l) and [0.25 μ M] adenylated 3'-adapter (0.5 μ l) in 0.2 ml Thermo-Tubes (Thermo Scientific). To prevent secondary structures, mix were heated for 3 min at 70°C, then kept on ice while adding [50%] PEG 8000 (2.4 μ l), 80 U of truncated T4 RNA ligase 2 K227Q (0.4 μ l) and the

corresponding buffer (1ul) (all provided by NEB). Mix were incubated for 90 min at 25°C. After addition of [1 uM] 3'-adaptor (0.5 ul) and a new 70°C/ice cycle, mix were added with 3 U of T4 RNA ligase 1 (0.4 ul) (NEB) and [10 mM] ATP (1 ul) and incubated for 90 min at 25°C. In a third step, mix were added with [100 uM] RT-primer (0.5 ul), submitted to a 70°C/ice cycle, then added with 60 U of the Superscript III reverse transcriptase (0.65 ul), [0.1M] DTT (0.7 ul), and 5X buffer (3.1 ul) (all from Life Technologies) and [10 mM each] dNTP (0.7 ul), and incubated for 90 min at 50°C. Finally, mix were added with [100 uM] 3'- PCR-primer (0.6 ul), [100 uM] 5'-PCR-primer (0.3 ul) and 2X Master Mix Phusion enzyme (NEB) (15 ul). Reaction mix were splitted into 2 tubes to enhance thermic exchange, denaturated for 1 min at 98°C and submitted to 16 cycles of PCR (20s at 98°C, 30s at 55°C, 25s at 72°C). PCR products were size-fractionated on a 6% polyacrylamide gel so that ~100-bp cDNAs could be separated from the 75-bp primer dimers.

Early multiplexing strategies used tagged 3'-adaptors²¹. Although these adaptors only display 4-6 base differences out of 20 bases, they were later shown to introduce artefactual differences in miRNA expression²³ (and A.B-T. and L.A. personal data). As a consequence, data relying on these multiplexing strategies seem to be reliable only for large (>5-10) expression differences. To avoid the introduction of artefactual differences, we developed a strategy that introduced barcodes at the PCR step. PCR works at temperatures that minimize differences of secondary structures between single-strand molecules. We used a set of 3'-PCR-primers with whole complementarity to the 3'-adaptor but a bulge of 2 bases at position 22. Control cDNA libraries were built from RNA of one ARC as described²⁰. When necessary, efficiency factors were calculated and used to individually correct miRNAs. cDNA libraries built from biological replicates were barcoded with the same 3'-PCR-primer and sequenced in different lanes of an Illumina's genome analyzer GAIIX.

miRNA expression profiling

Sequencing quality was ascertained using the FASTQC program (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). cDNA libraries were demultiplexed using our scripts on the basis of the first eleven bases of the 3' adaptor and reads were trimmed from the 3' adaptor sequence. Reads <16 bases which could not be mapped on the genome were discarded. Reads >16 bases were grouped into unique sequences and analyzed with the miRanalyzer server (<http://bioinfo5.ugr.es/miRanalyzer/miRanalyzer.php>) to build individual miRNA

expression profiles. This server used the miRBase database version 18 (<http://www.mirbase.org>) to identify miRNA sequences and additional databases to classify non-miRNA sequences. Sequences that did not fit these database categories but matched the rat reference genome, together with their flanking-sequences were tested for the encoding of putative novel miRNAs by using the RNAfold or miRDeep programs. No new miR gene could be identified. We allowed two mismatches with the BN/SsNHsd/Mcwi reference genome in order to take into account nucleotide differences that could reflect differences between the Wistar and reference genomes, or be introduced during the library construction, sequencing procedure, and/or nucleotide differences resulting from an editing process (only a few thousands of reads were missed when no mismatch was allowed for data alignment with the reference genome).

The denomination of miR-3p and miR-5p is currently replacing the denomination of miRNA and miRNA* that did not take into account the maturation of both strands. Note that denomination changes are in process in the miRBase database so that, depending on the miRNA, one or the other denomination were used. miRNA maturation also produce isomiRs (see Introduction). Throughout the text and Tables, 5'-isomiRs distinct from reference miRNAs in the miRBase database are identified as miR-X-hairp. 3' isomiRs are grouped into one name.

miRNA expression profiles were normalized using the DESeq procedure²⁴.

RT-quantitative PCRs

POMC and GAPDH transcripts were analyzed by reverse transcribing 1 ul (30-60 ng) of DNA-free RNAs, using 20 U of the Superscript III reverse transcriptase, [0.1M] DTT (0.3 ul), 5X buffer (1.2 ul) (all from Life Technologies), [10 mM each] dNTP (0.3 ul) and random primers in a volume of 6 ul. Mix were incubated for 90 min at 50°C. RT products were ten-fold diluted. qPCRs were performed using 2.5 ul of the diluted RT-products, specific primers derived from the rat genes (IDs: 24664 and 24383) and 5 ul of SYBR oremix Ex Taq master Mix (Takara RR820A) in a volume of 10 ul using a Step-one apparatus. Samples were heated for 20 s at 95°C and submitted to amplification cycles consisting of 2s at 95°C and 20 s at 60°C. Levels of POMC transcripts were quantified relatively to those of GAPDH transcripts, and relatively to those of one progeny of stage P28, by using the $\Delta\Delta C_t$ method²⁵ and experimentally ascertained amplification efficiencies.

miRNA expression were analyzed by reverse transcribing 1 ul of diluted small RNAs (1 ul in 14 ul) into cDNAs using TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit and specific TaqMan MicroRNA Assays listed in Supplemental table S7 (Life Technology) in a volume of 6 ul. 2 ul of RT products were amplified using the TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technology) in a volume of 10 ul. Samples were heated for 20 s at 95°C and submitted to amplification cycles consisting of 1 s at 95°C and 20s at 60°C. Expression of miR-7a-5p, miR-24-3p, miR-29-3p, miR-137-3p and miR-1843-5p were quantified relatively to those of miR-124-3p, and relatively to those of stage P28, by using the $\Delta\Delta C_t$ method²⁵ and experimentally ascertained amplification efficiencies.

Statistical measures

Individual group statistics were calculated using Mann and Whitney tests and corrected for multiple testing when necessary according to the false discovery rate method described by Benjamini and Yekutieli²⁶. miRNA expression with adjusted P-values (adj-p-values) <0.05 were considered as statistically significant. Data in the text are given as mean +- SEM.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the University Paris-Sud/Paris-Saclay, and a grant from Danone/FRM 2011. X. B. was supported by a grant from FRM. Sequencing has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing platform of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif, www.imagif.cnrs.fr). We thank Dominique Martel for Discussion, Sabrina Davis and Alexandra Henrion-Caude for critical reading of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

Conceived and designed the experiments: C-M.V., M.T., A.B-T. and L.A.

Performed the experiments: S.D-K., C.B., C-M.V., M.T., A.B-T. and L.A.

Analysed the data: S.D-K., C.B., X.B., G.B., A.B-T. and L.A.

Wrote the paper: A.B-T. and L.A

All authors reviewed the manuscript

ACCESSION CODES

Raw data files have been submitted at the SRA database (NCBI) under the study accession number SRP058705.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

- 1 - Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233 (2009).
- 2 – Ha, M. & Kim, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 509-524 (2014).
- 3 – Linsen, S.E., de Wit, E., de Bruijn, E. & Cuppen, E. Small RNA expression and strain specificity in the rat. *BMC Genomics* 11, 249 (2010).
- 4 – Garbacki, N., Di Valentin, E., Huynh-Thu, V.A., Geurts, P., Irrthum, A., Crahay, C., Arnould, T., Deroanne, C., Piette, J., Cataldo, D. & Colige, A. MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: a relationship with mRNAs targets. *PLoS One* 6, e16509 (2011).
- 5 – Bouret, S.G., Draper, S.J. & Simerly, R.B. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding. *J Neurosci.* 24, 2797-2805 (2004a).
- 6 – Bouret, S.G., Draper, S.J. & Simerly, R.B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304, 108-110 (2004b).
- 7 – Bouret, S.G., Gorski, J.N., Patterson, C.M., Chen, S., Levin, B.E. & Simerly, R.B. 2008. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell Metab* 7, 179-185 (2004b).
- 8 – Vogt MC et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell* 156(3), 495-509 (2014).
- 9 – Delahaye, F., Breton, C., Risold, P.Y., Enache, M., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., Lesage, J. & Vieau, D. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology.* 149, 470-475 (2008).

- 10 – Couvreur, O., Ferezou, J., Gripois, D., Serougne, C., Crépin, D., Aubourg, A., Gertler, A., Vacher, C-M. & Taouis, M. Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PLoS One*. 6, e18043 (2011).
- 11 – Schneeberger M. et al. Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Mol Metab*. 2(2):74-85 (2012).
- 12 – Greenman Y. et al. Postnatal ablation of POMC neurons induces an obese phenotype characterized by decreased food intake and enhanced anxiety-like behavior. *Mol Endocrinol*. 27(7):1091-102 (2013).
- 13 – Vinnikov IA et al. Hypothalamic miR-103 protects from hyperphagic obesity in mice. *J Neurosci*. 34(32):10659-74 (2014).
- 14 – Hafner, M., Renwick, N., Brown, M., Mihailović, A., Holoch, D., Lin, C., Pena, J.T., Nusbaum, J.D., Morozov, P., Ludwig, J. et al. RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA*. 17, 1697-1712 (2011).
- 15 – Sun, Y., Luo, Z.M., Guo, X.M., Su, D.F. & Liu, X. An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. *Front Cell Neurosci*. 9, 193 (2015).
- 16 – Papadopoulou, A.S., Serneels, L., Achsel, T., Mandemakers, W., Callaerts-Vegh, Z., Dooley, J., Lau, P., Ayoubi, T., Radaelli, E., Spinazzi, M. et al. B. Deficiency of the miR-29a/b-1 cluster leads to ataxic features and cerebellar alterations in mice. *Neurobiol Dis*. 73,275-288 (2014).
- 17 – Roshan, R., Shridhar, S., Sarangdhar, M.A., Banik, A., Chawla, M., Garg, M., Singh, V.P. & Pillai, B. Brain-specific knockdown of miR-29 results in neuronal cell death and ataxia in mice. *RNA*. 20,1287-97 (2014).

- 18 – Herzer, S., Silahtaroglu, A. & Meister, B. Locked nucleic acid-based in situ hybridisation reveals miR-7a as a hypothalamus-enriched microRNA with a distinct expression pattern. *J Neuroendocrinol.* 24, 1492-504 (2012).
- 19 – Zhang L. et al. MicroRNA expression profiling of the porcine developing hypothalamus and pituitary tissue. *Int J Mol Sci.* 14(10):20326-39 (2013).
- 20 – Topper VY, Walker DM, Gore AC. Sexually dimorphic effects of gestational endocrine-disrupting chemicals on microRNA expression in the developing rat hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol.* 414:42-52 (2015).
- 21 – Vigneault, F., Sismour, A.M., Church, G.M. Efficient microRNA capture and barcoding via enzymatic oligonucleotide adenylation. *Nat Methods* 5: 777-779 (2008).
- 22 - Amar, L., Benoit, C., Beaumont, G., Vacher, C-M., Crepin, D., Taouis, M. & Baroin-Tourancheau, A. MicroRNA expression profiling of hypothalamic arcuate and paraventricular nuclei from single rats using Illumina sequencing technology. *J Neurosci Methods* 209, 134-143 (2012).
- 23 – Alon, S., Vigneault, F., Eminaga, S., Christodoulou, D. C., Seidman, J. G., Church, G. M. & Eisenberg, E. Barcoding bias in high-throughput multiplex sequencing of miRNA. *Genome Res.* 21, 1506-1511(2011).
- 24 - Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106 (2010).
- 25 - Schmittgen TD1 & Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 3, 1101-1108 (2008).
- 26 - Benjamini, Y. & Yekutieli, D. The control of the false discovery rate in multiple testing. *Annals of Statistics* 29, 1165-1188 (2001).

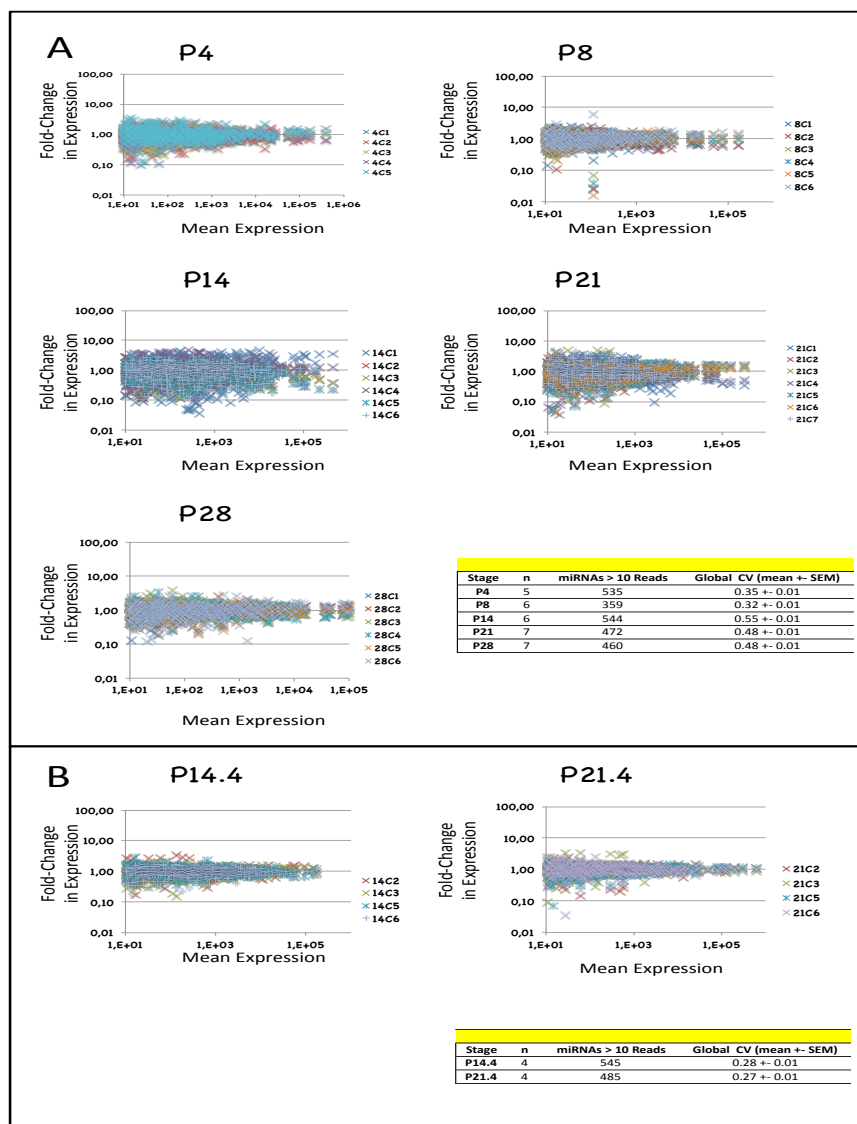


Figure 1. Differences in miRNA expression homogeneity across biological replicates suggest higher dynamics of miRNA expression in hypothalamic ARC/ME at postnatal stages P14 and P21.

(A) Plots depict miRNA relative expressions of ARC/ME at P4, P8, P14, P21 or P28. Stages are indicated above each plot. In each plot, the X-axis denotes mean normalized read counts between 5-7 biological replicates, the Y-axis, fold changes of expression relatively to the mean expression. Only miRNAs identified by >10 reads are shown. X- and Y-axes are drawn using a log₁₀ scale. Each dot represents the relative expression of an individual miRNA expression and each color, a biological replicate. Dots of positive or negative values on the Y-axis denote up- or down-regulated miRNA expressions relatively to mean expressions, respectively. For a given miRNA, values on the Y-axis close to 1 denote miRNAs of homogeneous expression. Note that many Y-values were distant from 1 for miRNAs of low mean expression. This accounted for the fact that the lower the mean expression, the less precise its quantification. Coefficients of variations (standard deviation/mean; CV) were calculated for each miRNA (see Supplemental Table S2), and global CV (mean ± SEM), for each stage. Table in bottom right corner summarizes data for each stage. **(B)** Sub-stages P14.4 and P21.4 could be identified at stages P14 and P21, respectively.

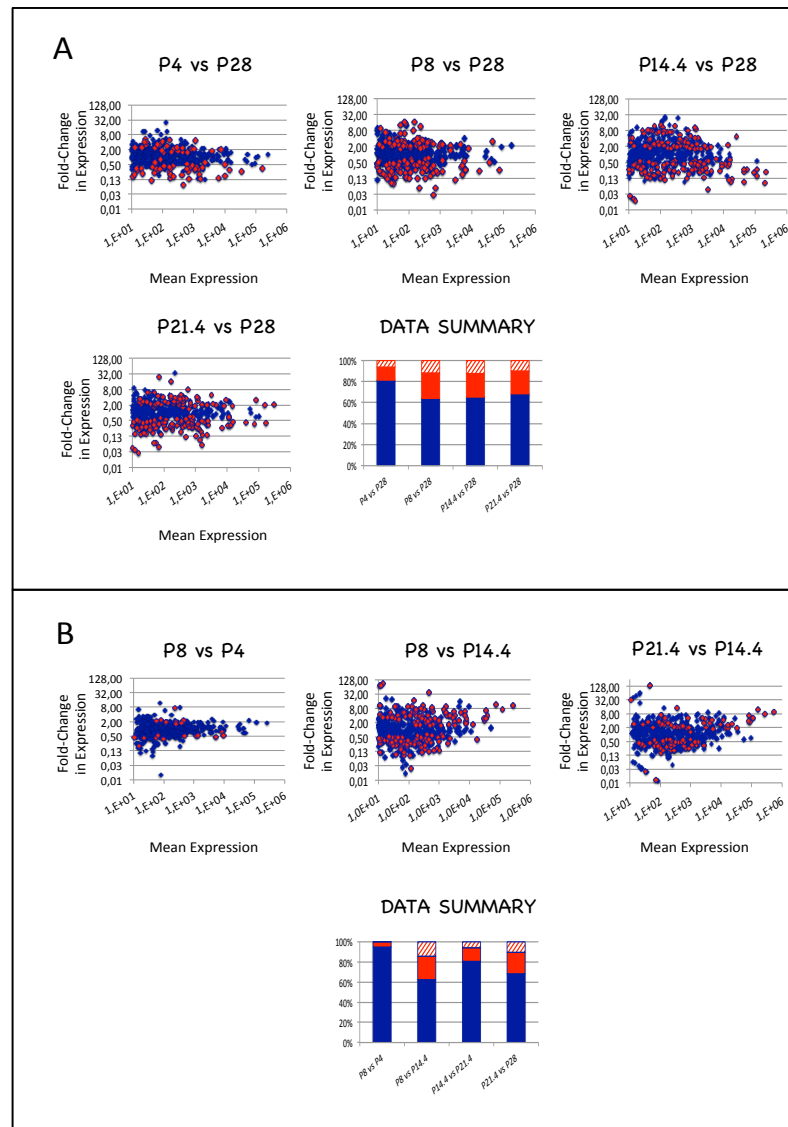


Figure 2. Substantial changes in miRNA expression mark ARC/ME development.

(A) Scatter plots depict fold-change in miRNA expression of ARC/ME at P4, P8, P14.4 or P21.4 versus P28. In each plot, the X-axis denotes mean normalized read counts between P4, P8, P14.4, P21.3 or P21.4 and P28, the Y-axis, fold changes in miRNA expression. Positive or negative values on the Y-axis denote up- or down-regulated miRNA expressions relatively to expression at P28, respectively. X- and Y-axes are drawn using \log_{10} or \log_2 scales, respectively. Blue dots denote miRNAs with no significant expression misregulation. Red dots denote miRNAs with significant expressions misregulation as identified by $\text{adj-p-values} < 0.05$. p-values were calculated with the Mann and Whitney test and adjusted for multiple testing using the method described in Benjamini and Yekutieli (2001). In histogram in bottom right corner red, blue bars identify percentages of miRNAs with no significantly misregulation, red bars identify percentages of miRNAs significantly misregulated and hatched bars, miRNAs with down-regulation < 0.33 or up-regulation > 3.0 (sum=100%). **(B)** Scatter plots depict fold-change in miRNA expression of ARC/ME between side-stages compared by pairs. miRNAs miR-298* and 532-3p in comparison P8 vs P14.4 and miR-193-3p in comparison P14.4 vs P21.4 are out of plots. For plots depicting changes occurring between P21.4 and P28, refer to (A).

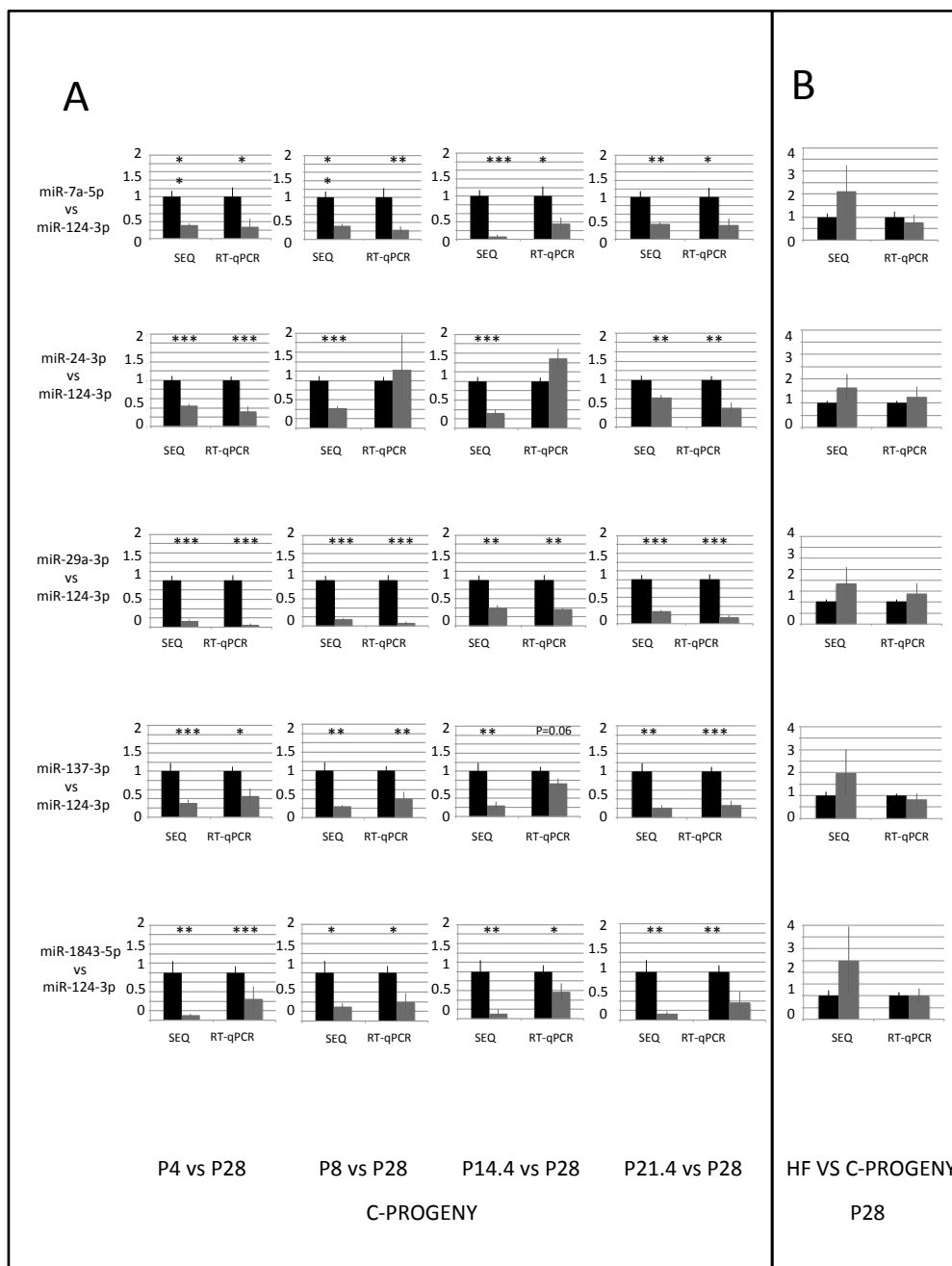


Figure 3. RTqPCR quantification versus sequencing quantification of miRNA expression.

(A) Ratios of miR-7a-5p, miR-24-3p, miR-29-3p, miR-137-3p and miR-1843-5p expression to miR-124-3p expression at P4, P8, P14.4 and P21.4 were compared to ratios at P28 using data recovered from HTS or RT-qPCR technologies. Data are organized in lines (1 miRNA/line) and columns (one stage/column). The reference ratio of 1 at P28 is shown as black bars while ratios at P4, P8, P14.4, P21.3 and P21.4 are shown as grey bars. p-values <0.05, 0.01 and 0.001 are identified by *, ** and *** symbols, respectively. All data are expressed as mean +/- SEM. **(B)** Ratios of miR-7a-5p, miR-24-3p, miR-29a-3p, miR-137-3p and miR-1843-5p expression to miR-124-3p expression were calculated at P28 for progeny born to dams fed a balanced diet and compared to those of progeny born to dams fed an unbalanced diet.

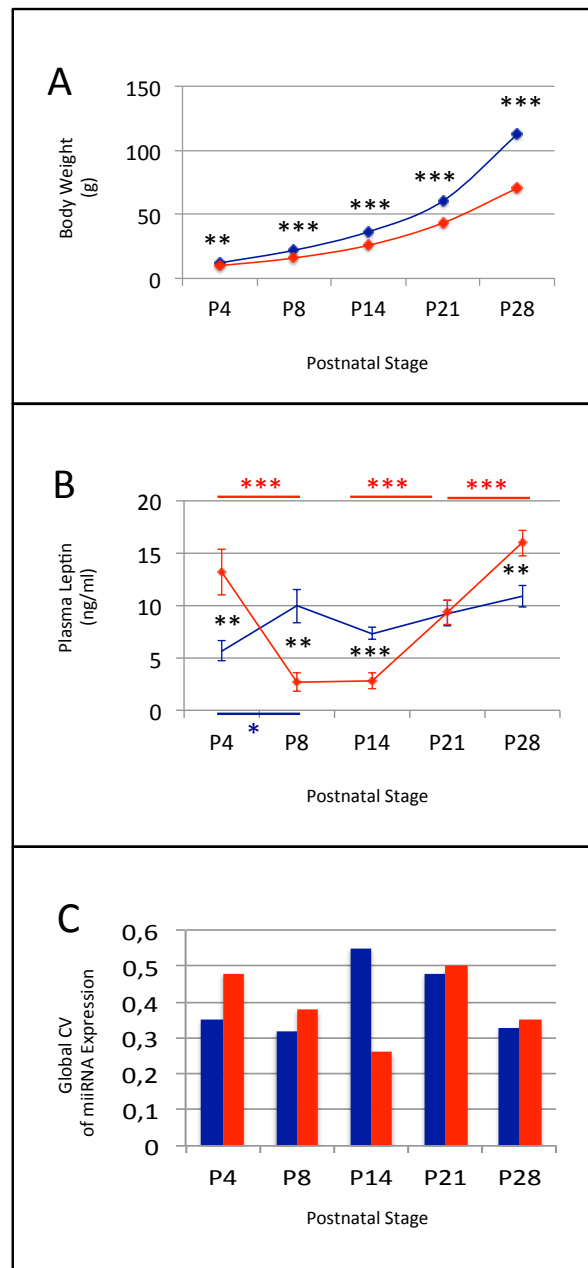


Figure 4. Maternal unbalanced diet impairs progeny body growth and plasma leptin levels.

Body weight (**A**), plasma leptin levels (**B**) and global CVs of miRNA expression (**C**) in C- and HF-progeny. Data are shown as mean \pm SEM in (A) and (B). C- and HF-progeny are identified by blue and red colors, respectively. Both progeny displayed high homogeneity in body weight at P4, P8, P14, P21 or P28, and hence very low SEMs. Symbols *, ** and *** identified p-values <0.05, 0.01 and 0.001, respectively. Symbols in blue and red identify p-values calculated in side stage comparisons. Black symbols identify p-values calculated in progeny comparisons

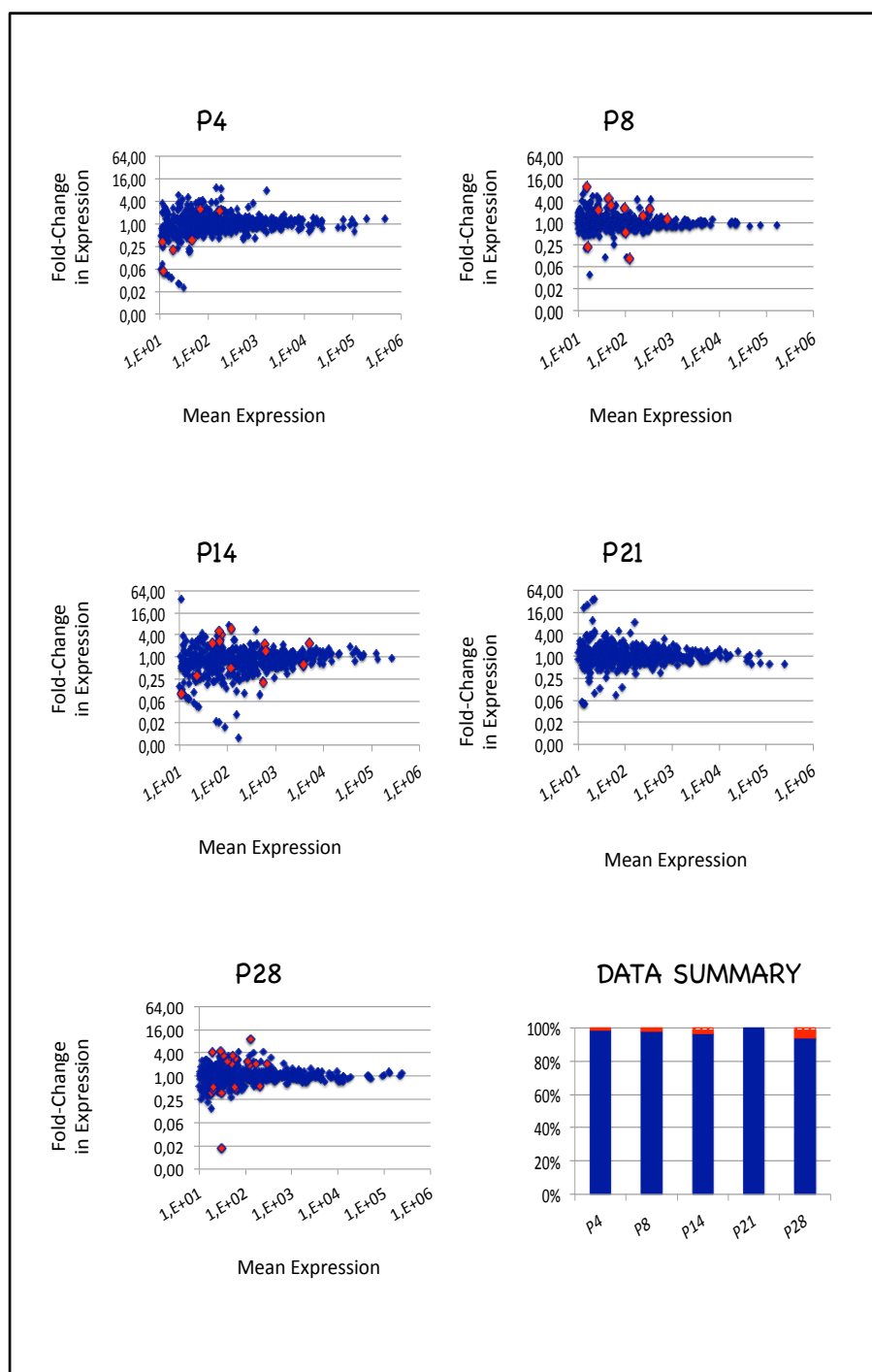


Figure 5. miRNA transcriptomes are almost unmodified in ARC/ME of HF-progeny.

Scatter plots depict comparisons of miRNA expressions of ARC/MEs of progeny born to dams fed a balanced or unbalanced diet at P4, P8, P14, P21 or P28. See the legend of Figure 2. In histogram in bottom right corner, only the blue and red bars can be seen. Hatched bars that account for <2% of the data can not be seen.

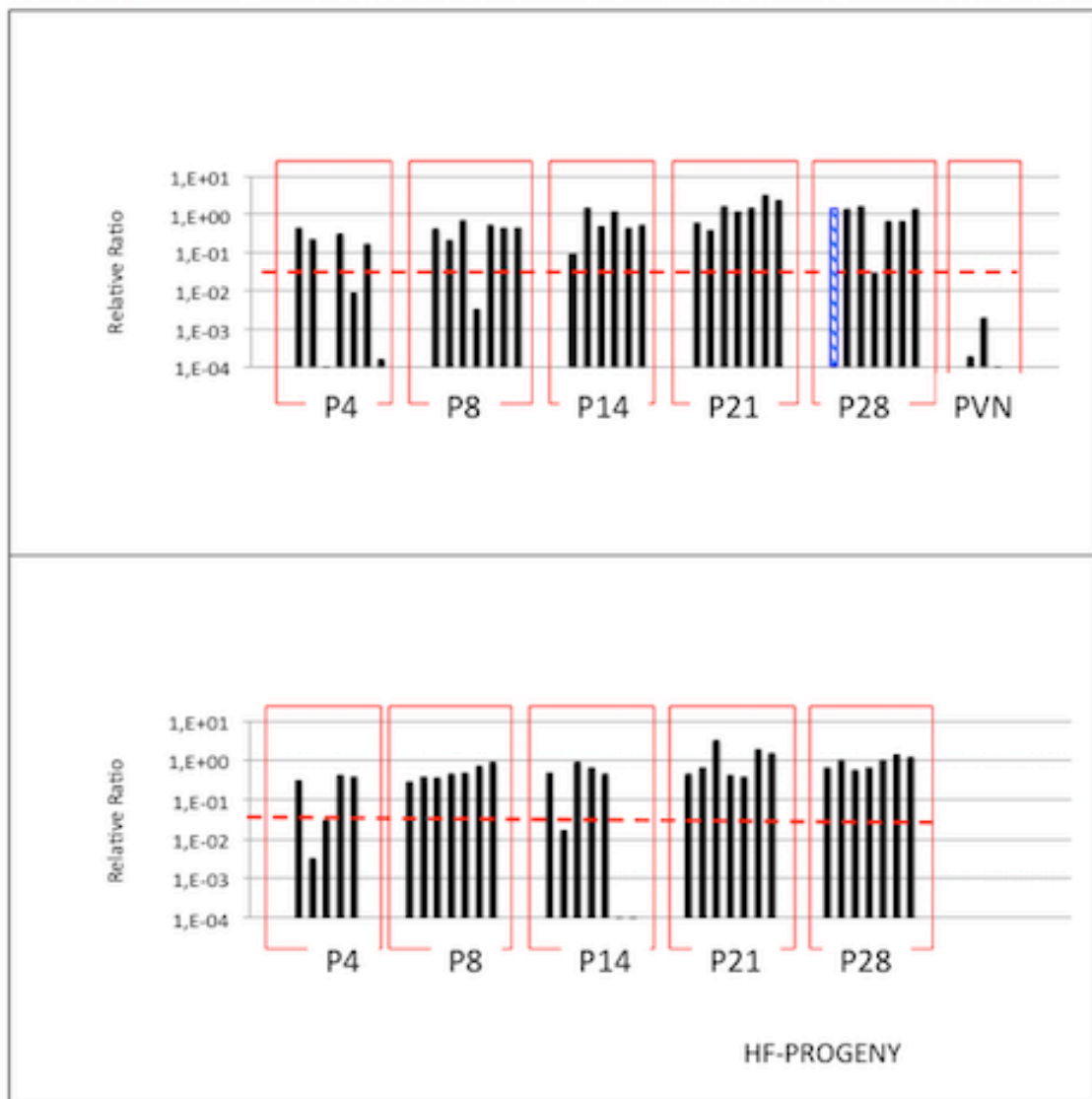


Figure S1. Assessment of ARC/ME purity.

(UP) POMC transcripts were quantified relatively to GAPDH transcripts in ARC/MEs at stages P4, P8, P14, P21 and P28 by using RT-qPCRs. PVNs of 3 adults were used as POMC non-expressing controls. The relative ratio of POMC to GAPDH mRNAs of one ARC/ME at stage P28 (identified by a blue hatched bar) was taken as the reference ratio of 1. Note that the Y-axis is drawn using a log₁₀ scale. PVNs displayed relative ratios lower than 0.0019. The relative ratio of 0.019 (10 fold higher than the highest PVN relative ratio) was therefore taken as the threshold value for assessing ARC/ME purity. This threshold is drawn as a dashed red line. Three ARC/MEs of stage P4 and 1 of stage P8 were discarded. One ARC/ME of P28 which ratio was much lower than the other values of the P28 sample (lower than mean minus 1.7 standard deviation) was also discarded. **(BOTTOM)** The same analysis was performed on ARC/MEs of HF-progeny at stages P4, P8, P14, P21 and P28. Two ARC/MEs of stage P4 and 3 of stage P14 were discarded.

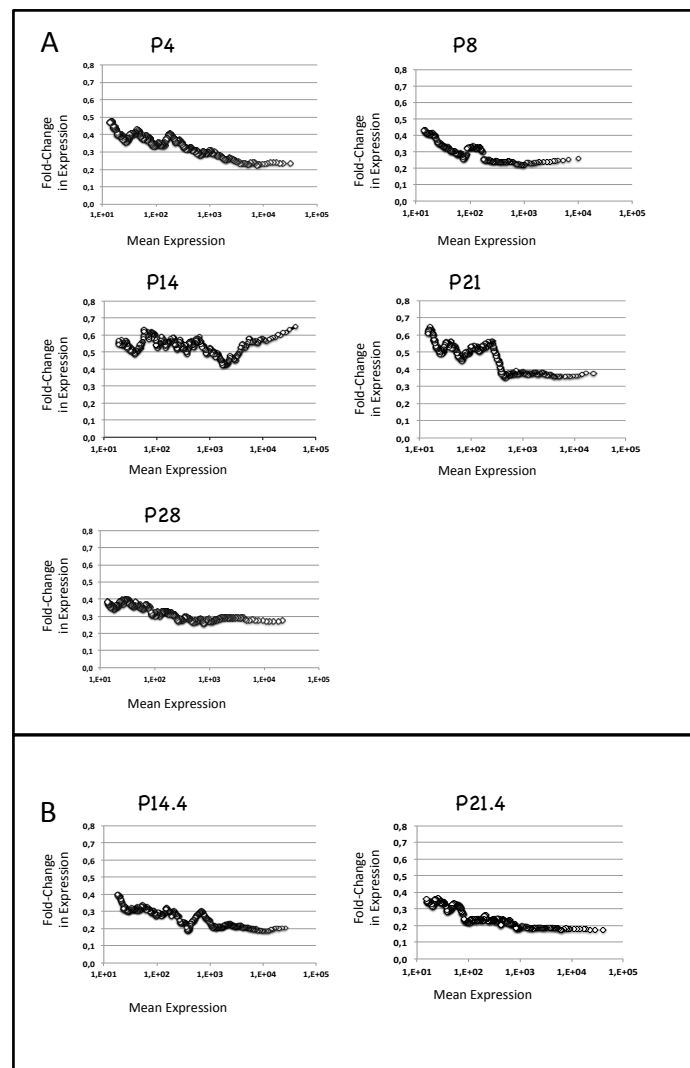


Figure S2. Quantification of miRNA expression homogeneity across ARC/ME biological replicates.

Levels of homogeneity were quantified by computing the coefficients of variation of expression (ratios of standard deviation to mean) either over all miRNAs (global CVs) or over sliding windows of 50 miRNAs of decreasing abundance (sliding CVs). (A) Sliding CVs at stage P4, P8, P14, P21 and P28. Bulge at stage P8 is the consequence of the high CV of miR-328-3p. (B) Sliding CVs at stages P14.4 and P21.4.

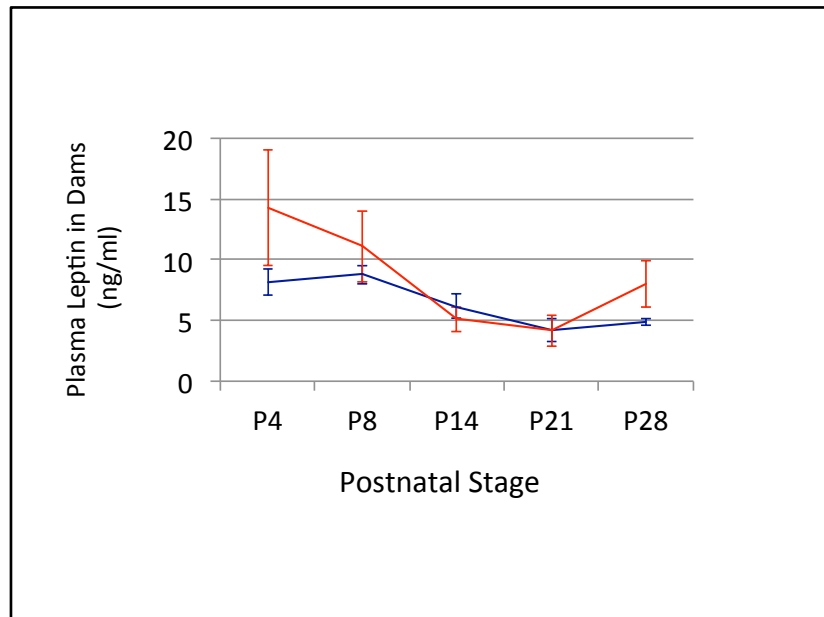


Figure S3. Dams of C- and HF-progeny display similar levels of plasma leptin.

Data are shown as mean \pm SEM. Dams of C- and HF-progeny are identified by blue and red colors, respectively

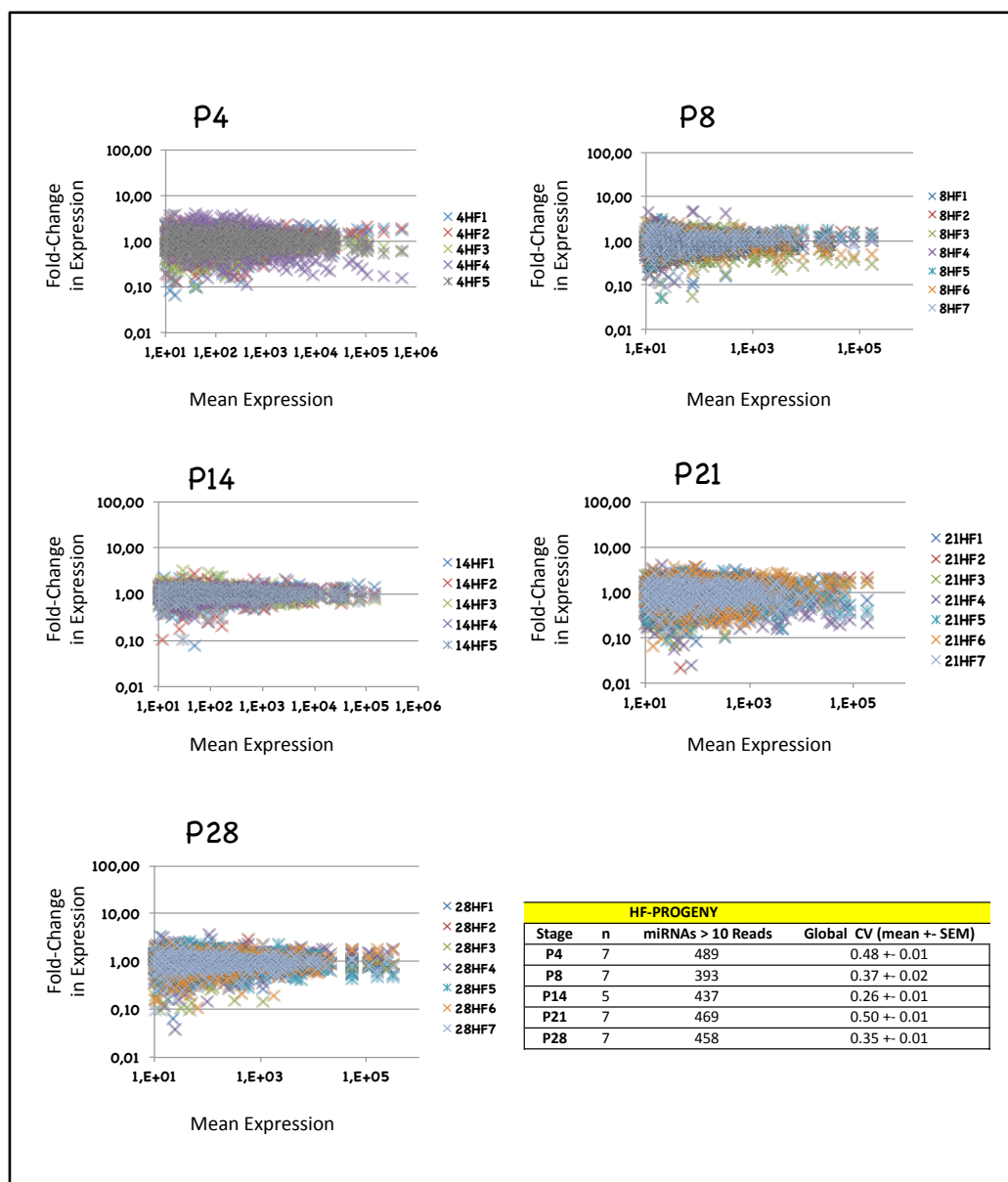


Figure S4. Analysis of miRNA expression homogeneity across ARC/ME biological replicates in HF-progeny.

Plots depict miRNA relative expressions of ARC/MEs at P4, P8, P14, P21 and P28. Stages are indicated above each plot. In each plot, the X-axis denotes mean read counts between biological replicates, the Y-axis, fold changes of expression relatively to the mean expression. Only miRNAs identified by >10 reads are shown. X- and Y-axes are drawn using a log(10) scale. Each dot represents the relative expression of an individual miRNA expression and each color, a biological replicate. Dots of positive or negative values on the Y-axis denote up- or down-regulated miRNA expressions relatively to mean expressions, respectively. Values on the Y-axis close to 1 denote miRNAs of highly homogeneous expression. Many Y-values were distant from 1 for miRNAs of low mean expression. This accounted for the fact that the lower the mean expression, the less precise its quantification. Coefficients of variations (standard deviation/mean; CV) were calculated for each miRNA (see Supplemental Table S5), and global CV (mean +/- SEM), for each stage. Table in bottom right corner summarizes data for each stage.

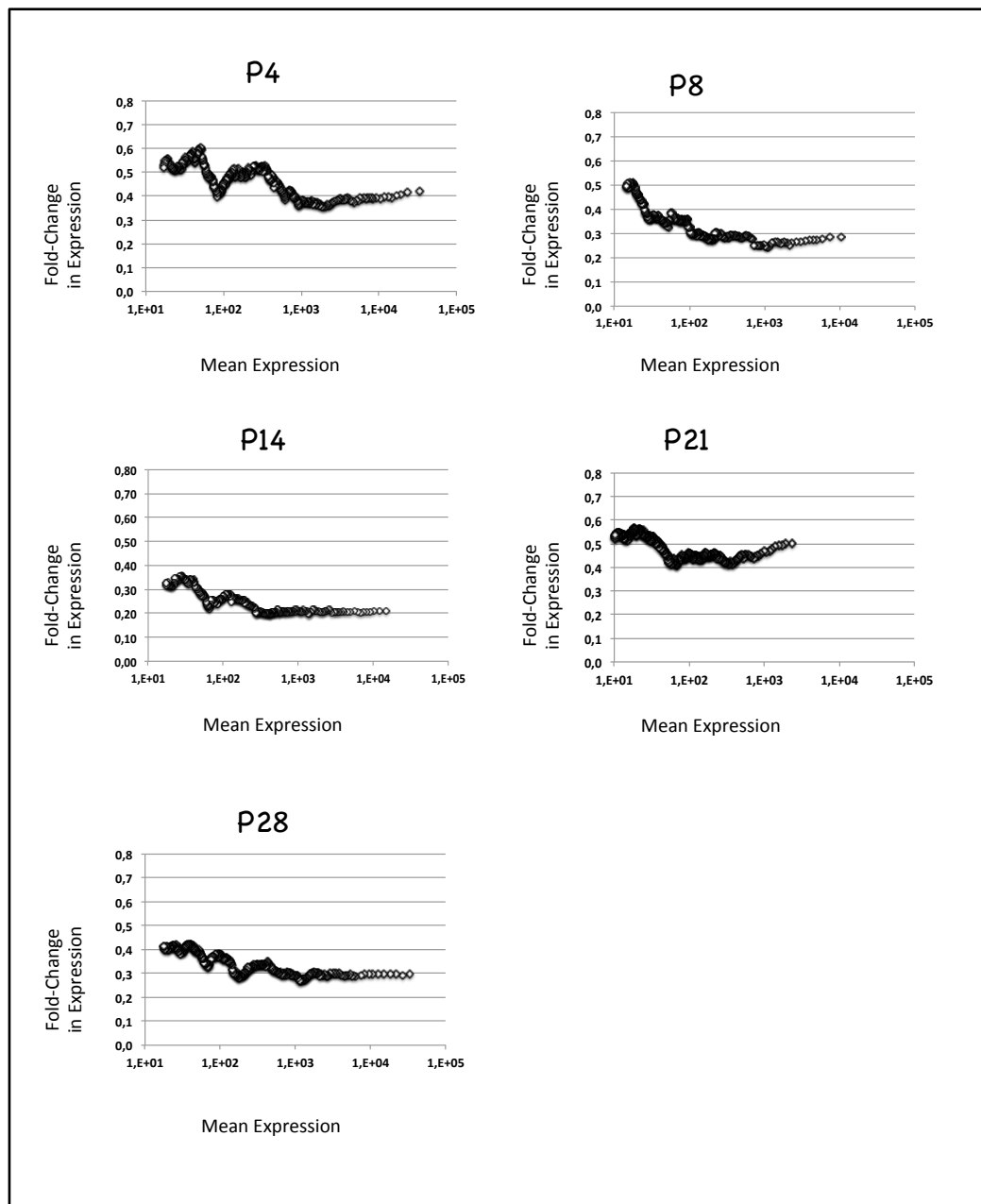


Figure S5. Quantification of miRNA expression homogeneity across ARC/ME biological replicates in HF-progeny

Levels of homogeneity were quantified by computing the coefficients of variation of expression (ratios of the standard deviation to the mean) either over all miRNAs (global CVs) (see Supplemental Figure S4) or over sliding windows of 50 miRNAs of decreasing abundance (sliding CVs) at stages P4, P8, P14, P21 or P28.

Supplemental Tables S1 – S7 are provided as individual .xls files. Note that the denomination of miR-3p/miR-5p is currently replacing the denomination of miRNA/miRNA*. Denomination changes are in process so that one or the other denomination were used depending on the miRNA in Tables S2-S6. In each Table, miRNAs are ranked by mean expression.

Table S1: Sequencing data.

Total read counts, counts and percentages of reads >16 bases and <40 bases, counts and percentages of miR-related reads among reads >16 bases and <40 bases are indicated for each cDNA library.

Table S2. miRNA expression profiles in developing ARC/ME.

Table S3. Comparisons of miRNA expressions at P4, P8, P14.4, or P21.4 versus P28.

Table S4. Comparisons of miRNA expressions between side-stages.

Table S5. miRNA expression profiles in developing ARC/ME of HF-progeny.

Table S6. Comparisons of miRNA expressions at P4, P8, P14 P21 and P28 between ARC/ME of C- and HF-progeny.

Note that comparisons at stages P14 and P21 involved C-progeny of sub-stages P14.4 and P21.4.

Table S7. Oligonucleotide Information.

Oligonucleotides used for cDNA library construction and specific RT-qPCR analyses are indicated.

ETUDE III

Article en préparation

NB : Du fait de leur longueur, les tables supplémentaires ne sont pas incorporées dans ce manuscrit. En attente de la publication de cette étude, elles sont disponibles sur demande : laurence.amar@u-psud.fr.

EXPRESSION ANTICORRELEE DES miARN DU NOYAU ARQUE HYPOTHALAMIQUE EN REPONSE A UN ENVIRONNEMENT HYPERLIPIDIQUE PERINATAL ET ADULTE

Lors de l'étude II, nous avons montré qu'au cours des premières semaines post-natales, la population de miARN de l'ARC des descendance C et HF subissait des changements d'expression similaires. Ces changements étaient massifs et robustes.

Nous avons analysé la programmation d'expression des populations de miARN dans l'ARC des descendants juvénile (2,5 mois) et adulte (7 mois).

Au sevrage (P28), les descendance C et HF ont été nourries au régime C. Les descendance HF qui présentent un déficit de poids corporel (-37%, $p < 0,05$) et une hyperleptinémie (+40%, $p = 0,004$) montrent une même homéostasie glucidique que les descendance C.

A 2,5 mois, les descendance HF rattrapent en partie le poids des descendance C (-15%, $p < 0,001$) et présentent les mêmes leptinémie, insuliniémie et glycémie.

A 4,5 mois, les descendance HF et C ont été séparées en deux groupes et l'un deux a été transféré sous régime HF durant 2,5 mois. J'utiliserai la terminologie suivante pour désigner les descendance ; CC, HFC, CHF et HFHF, le premier régime correspond au régime périnatal et le deuxième au régime adulte.

A 7 mois, nous avons calculé le gain de poids relatif des descendance en rapportant le poids du jour J au poids à 4,5 mois. Les descendance CHF et HFHF montrent un gain de poids relatif supérieur (+17%, $p < 0,01$) aux descendance CC et HFC (+8%, $p < 0,01$). Le régime HF provoque une hyperleptinémie ($p < 0,05$), reflétant les propriétés obésogènes de ce régime. Toutefois le régime maternel HF n'a pas d'impact sur le gain de poids relatif ou la leptinémie des adultes. Les descendance HFHF montrent une hyperglycémie et les descendance HFC montrent une hyperinsuliniémie. Bien que le régime maternel HF n'ait aucun impact sur le gain de poids relatif et la leptinémie des descendance adultes, cet environnement conditionne leur métabolisme glucidique.

L'environnement périnatal HF induit-il une programmation d'expression des miARN dans le noyau arqué de la descendance juvénile et adulte ?

Nous avons établi les profils d'expression individuels de plus de 500 miARN dans l'ARC de la descendance adulte âgée de 7 mois. Nous avons observé que le régime maternel HF induit une programmation d'expression des miARN, 19 à 31% ($p < 0,05$) des miARN montrent une expression différentielle. 37 miARN montrent une expression modifiée par l'environnement HF adulte chez la descendance C. 22 de ces miARN voient leur expression modifiée également par l'environnement périnatal HF. Nous avons observé une corrélation positive ($R = 0,74$) entre les différences d'expression induites par l'environnement périnatal et adulte. 107 miARN sont différentiellement exprimés par le régime maternel HF lorsque les descendances adultes sont sous régime HF dont 48 miARN voient leur expression modifiée également par l'environnement périnatal HF. Nous avons observé une corrélation négative entre les différences d'expression induites par l'environnement périnatal et l'environnement adulte lorsque les deux environnements concordent ($R = -0,79$). Le régime maternel HF induit une différence d'expression de 59 nouveaux miARN lorsque la descendance est sous régime HF à l'âge adulte.

En conclusion, nous avons montré qu'un environnement périnatal HF conditionne la leptinémie et la croissance pondérale de la descendance au sevrage. Ces désordres métaboliques s'estompent avec l'âge programmant le métabolisme glucidique de la descendance adulte. Cet environnement périnatal conditionne également une grande partie des miARN de l'ARC. Nous observons une corrélation entre les différences d'expression induites par les environnements périnataux et adultes chez la descendance C et une anti-corrélation chez la descendance HF.

NB : les matériels et méthodes sont identiques à ceux figurant dans l'étude II.

ANTICORRELATED MIRNA REPOSES TO PERINATAL AND ADULT UNBALANCED DIETS IN HYPOTHALAMIC ARCUATE NUCLEUS

Charlotte Benoit^{1,2#}, Soraya Doubi-Kadmiri^{1#}, Xavier Benigni^{1,3}, Laure Riffault¹, Ghislane Poizat¹, Claire-Marie Vacher¹, Mohammed Taouis¹, Anne Baroin-Tourancheau¹ and Laurence Amar^{1*}

1 Université Paris-Saclay, Université Paris-Sud, CNRS, UMR 9197-Institut de Neurosciences Paris-Saclay, Orsay F-91405, France

2 Present address : Nodea medical, 1 mail du Professeur Georges Mathé, Villejuif F-94800, France

3 Present address : Institute of Plant Sciences - Paris-Saclay, 2 Rue Gaston Crémieux, Evry F-91000, France

These authors contributed equally to this work

* Corresponding author : laurence.amar@u-psud.fr

Short Title : miRNA expression programming in ARC

ABSTRACT

Unbalanced intrauterine or early postnatal nutritional environments can lead to metabolism disorder in adults, including long-term dysregulation of energy and/or glucose homeostasis. Such disorders have been frequently associated with differences in mRNA expression. MicroRNAs (miRNAs) are non-coding RNAs that modulate gene expression at the post-transcriptional level. Here, we investigate whether maternal diets can affect miRNA expression in adult hypothalamic arcuate nucleus (ARC), an important control center of energy and glucose homeostasis, in *Rattus norvegicus*. We characterize the expression of > 500 miRNAs in the ARC of 2.5- and 7 month-old progeny of dams fed either control or high-fat diets during gestation and lactation (C-progeny and HF-progeny, respectively). Although no difference in miRNA expression could be detected at 2.5 months between C- and HF-progeny fed the C diet after weaning, 150 miRNAs expression changes were observed at 7 months. For one third of these miRNAs, replacing the C with a HF diet from 4.5 to 7 months suppressed these changes. These results reveal a delayed, age- and adult diet-dependent effect of perinatal nutrition on the expression of a large proportion of miRNAs in the ARC of adult rats. Thus, adult miRNA expression can respond to both perinatal and adult nutritional environments.

INTRODUCTION

Retrospective epidemiologic analyses of causal factors of chronic diseases of the middle age have identified early-life environments as potential factors. Although nutrition, infections, smoking or pollution could have long-term effects, clear identification of causal circumstances in human is rendered difficult by the relative scarcity of well-documented data relatively to the distant perinatal and middle-age periods as well as to the inter-period.

Several mammalian models have been developed to study the impact of intrauterine and/or early-postal environments on the long-term healthy or pathophysiologic status of adults. Experimental evidences showed in particular that the maternal diet of the perinatal period can alter cardiovascular and metabolic functions of adult rodent progeny. Undernutrition, low-protein or high-fat diets given to dams during the perinatal period in particular can impact energy and glucose homeostasis.

In mammals brain, one of the primary centers regulating food intake, energy expenditure and glucose metabolism is the hypothalamus, a complex structure consisting of well-defined sub-structures also called nuclei and/or areas. Several hypothalamic nuclei participate in those controls amongst which the arcuate nucleus (ARC). ARC is adjacent to the third ventricle/cerebrospinal fluid compartment and median eminence that sense variations of circulating nutrients and hormones. ARC first-order neurons transfer corresponding information to second-order neurons that are located in a number of other hypothalamic as well as extra-hypothalamic regions.

Changes in energy and glucose homeostasis are supported by differences in gene expression in several tissues. Differences in gene expression can be controlled at the transcriptional level by changes in the epigenome, i.e. methylation of CpG dinucleotides and /or modifications of histones. Differences in gene expression can also be controlled at the post-transcriptional level by changes in the level of microRNAs (miRNAs).

miRNAs are small RNAs of 20-24 bases that finely tune mRNA expression. miRNA expression appears strictly required in embryon and adult somatic tissues. Deletion of Dicer, a key miRNA processing enzyme, is embryonic lethal in mice, and tissue-specific Dicer deletion results in developmental defects. miRNAs act throughout interactions with mRNA complementary bases. This results in decreased mRNA translation efficiency and/or stability and down-regulation of corresponding proteins.

Mammalian genomes harbor several hundreds of miRNA-encoding genes (miR genes), a large fraction of which is expressed in brain, individual brain structures or in the case of hypothalamus, in single nuclei. Because of the short size of the predicted miRNA:mRNA heteroduplex and large amounts of sequences in mRNA transcriptomes, algorithms that have been developed for target identification predicted each miRNA may control the expression of several hundreds of protein-coding genes. Bioinformatics analyses also predicted that the expression of most protein-coding genes may be controlled by miRNA combinations. Post-transcriptional regulation of gene expression therefore relies on cross-talks between populations of mRNAs and populations of miRNAs. Cracking miRNA and mRNA cellular concentrations will help to understand gene regulation in pathological and physiopathological status.

We have developed a rat model to characterise the impact of an unbalanced diet given to rat dams during the gestation and lactation periods on miRNA expression in ARC of progeny. In this model, we used a maternal diet, high in fat and moderate in proteins, that induced large differences in plasma leptin and body growth during the lactation period in comparison to progeny of dams fed a standard laboratory chow diet. We characterized the kinetics of miRNA expression in ARC/ME of the two progeny between postnatal stages P4 and P28 and showed that a small number of miRNAs, 3%-7%, displayed expression differences between P4 and P28.

Here we report analyses of energy homeostasis, glucose metabolism and miRNA expression of ARC in rats of 2.5 or 7 months that were born to dams fed balanced or unbalanced diet. We show that, in addition to hyperinsulinemia, an unbalanced perinatal diet programmed mal-expression of as many as 25% of miRNAs, and that part of which could be reverted when animals were fed the unbalanced diet for 10 weeks. We also show that, at 2.5 months, animals showed neither disinsulinemia nor miRNA misexpression.

RESULTS

Establishing an experimental scheme to identify interaction(s) between perinatal metabolic environment, age and/or adult diets on miRNA expression

In order to look forwards to the incidence of the perinatal metabolic environment on miRNA expression in ARC we have analyzed male progeny of 2.5 or 7 months born to Wistar dams fed a chow diet (18%, 23% and 59% of the energy content derived from lipids, proteins and carbohydrates, respectively, Safe, France, hereafter named C diet) or an unbalanced diet (46%, 16% and 38% of the energy content derived from lipids, proteins and carbohydrates, respectively, Safe, France, hereafter named HF diet) throughout the gestation and lactation periods (hereafter named C- and HF-progeny, respectively). Progeny body weight and plasma leptin were followed throughout lactation. Both parameters were similar at P4 but displayed large differences at later stages (see below).

C- and HF-progeny were weaned onto chow diet (Figure 1). As we wanted to look for possible interaction(s) between metabolic perinatal environments, ages and/or adult diets, both progeny were sacrificed either seven weeks later at the age of 2.5 months, or thirty weeks later at the age of 7 months, or after a shift to the HF diet between the ages of 4.5 and 7 months. Progeny of 2.5 months will be referred below as C- or HF-progeny according to their perinatal environment. Progeny of 7 months will be referred as CC, CHF, HFC, or HFHF according to the perinatal diet first and the adult diet second.

For each progeny, we used 6-7 biological replicates obtained from three different litters to limit breeding and/or housing bias. All progeny were sacrificed after a 14-16-hours fasting. To assess metabolic programming, relative gains of body weight were followed between 4.5 and 7 months, and levels of leptin, insulin and glucose were measured in plasma of fasted animals. To explore miRNA populations, each ARC was dissected and individual cDNA libraries (one library/ARC) were built using small RNAs of 18-36 bases and an Illumina-like protocol (see Materials and Methods).

HF perinatal environment induced inulino-resistance in adult but not juvenile rats

At weaning, HF-progeny displayed lower body weight (71 +/- 3 g vs 113 +/- 3 g, p-value < 0.001; 37% of body weight deficiency) and higher plasma leptin (16 +/- 1 ng/ml vs 11 +/- 1 ng/ml, p-value = 0.004) (Doubi-Kadmiri et al, manuscript submitted). Both progeny displayed similar levels of plasma insulin (Figure 2).

At 2.5 months, HF-progeny have partly recovered C-progeny (366 +/- 11g vs 428 +/- 10 g, p-value < 0.001; 15% of body weight deficiency). Both progeny displayed similar levels of plasma leptin (0.4 +/- 0.5 ng/ml vs 0.3 +/- 0.3 ng/ml), insulin and glucose (Figure 2). The two progeny also displayed similar levels of POMC mRNAs (Figure 3). At 4.5 months, HF-progeny have almost caught up C-progeny (517 +/- 13 g vs 568 +/- g 16, p-value < 0.01; 9% of body weight deficiency). At 7 months, HFC-progeny totally recovered C-progeny (562 +/- 16 g vs 590 +/- 25 g, p-value = 0.18).

Between the ages of 4.5 and 7 months, animal weights were recorded once a week and relative gains of body weight were calculated relatively to body weights at 4.5 months. Progeny CHF and HFHF displayed higher relative body weight gain (18% +/- 2% and 17% +/- 2%, respectively) than progeny CC and HFC (8% +/- 1% in both cases, p-values <0.01) demonstrating the obesogenic property of the HF diet (Figure 4). Progeny CC and HFC on one hand, progeny CHF and HFHF on the other hand, however displayed similar relative body weight gains indicating that the HF perinatal environment did not impact body weight gain of adults.

Progeny CC, CHF, HFC, or HFHF were also analyzed for circulating leptin taken as an indicator of body fat mass (Figure 4). Progeny CHF displayed higher levels of plasma leptin than animals CC (18 +/- 4 ng/ml vs 8 +/- 1 ng/ml, p-value < 0.05) as did progeny HFHF when compared to progeny CHF (15 +/- 4 ng/ml vs 5 +/- 1 ng/ml, p-value < 0.05). While progeny CHF and HFHF displayed similar leptinemia, progeny HFC showed a tendency to a lower level of leptin when compared to progeny CC (p-value = 0.054). These data confirmed the obesogenic property of the diet HF on adult animals, and a lack of impact of the perinatal environment on body weight and fat mass in adults fed chow, as well as in adults fed the HF diet.

In contrast to body weights and plasma leptin, plasma insulin and glucose uncovered metabolic programming in progeny HFC and HFHF (Figure 5). Progeny CC and HFC displayed different levels of insulin (1.4 +/- 0.5 ng/ml vs 7.6 +/- 2.5 ng/ml, p-value = 0.03). Progeny CHF in fact displayed a insulin level that was similar to that of progeny HFC and HFHF (7.6 +/- 2.8 ng/ml, 6.4 +/- 3.3 ng/ml, respectively). While hyperinsulinemia signified an insulin-resistant status in the three CHF, HFC and HFHF progeny, only progeny HFHF displayed hyperglycemia. Analyses of POMC mRNAs showed progeny CHF displayed specific levels when compared to progeny CC, HFC and HFHF (see Figure 3).

Together these data show that, although the perinatal HF environment has no impact on body weight gain and fat content on progeny, this environment programmed hyperinsulinemia in 7-months progeny fed chow from weaning, or the HF diet between 4.5 and 7 months.

HF perinatal environment induced programming of one fourth of the miRNAs expressed in ARC

Individual miRNA expression profiles were constructed for each ARC and 500-600 miRNAs were identified by more than 10 reads in the mean miRNA expression profiles (Supplemental Table S1).

To look forwards to the programming of miRNA expression in ARC by the perinatal HF diet, miRNA expressions were compared between the six combinations of 7-month progeny (Figure 6A & 7) (Supplemental Table S2). Here and below, p-values were corrected for false discovery rates and adj-p-values < 0.05 were retained as significant (see Materials and Methods). Differences in miRNA expression and differences of more than 3-fold (0.33 in cases of down-regulation and 3 in cases of up-regulation) were recorded in each combination (Figure 6B). All comparisons that integrated at least one progeny raised under the HF environment displayed a high percentage of differences of expression (19-31%), and of differences of expression of more than 3-fold (7-9%).

Differences in the proportion of differently expressed miRNAs between comparison of HFC- versus CC- progeny on one hand and other comparisons on the other hand were not due to differences in sample heterogeneity (Suppl. Figure S1). Inter-individual variation in miRNA expression were calculated within each progeny by calculating the ratio of the

standard deviation to mean value (variation coefficients or CVs) of each miRNA-related sequence (Table 1, Suppl. Tables S2 and S3). CVs were then plotted against the log of the mean expression values of each miRNA sequence profile. Interestingly comparison between progeny CC and CHF that only tested the impact of an adult HF diet only displayed 7% of differences and 3% of differences of more than 3-fold. No difference in miRNA expression could be identified in 2.5-month old C- and HF-progeny.

Altogether these data demonstrated a programming of the expression of a fifth to a fourth of the 500-600 miRNAs of ARC by the perinatal HF environment in 7-months progeny.

Defining a set of miRNA expression misregulated by HF perinatal or adult diet

Progeny CC and CHF displayed differences in expression for 37 miRNAs, demonstrating that the adult HF diet alone could induce miRNA expression misregulations. Twenty-three (62%) of these miRNAs also displayed expression differences between progeny HFC and CC, demonstrating that their expression could be also misregulated by the perinatal HF environment. Misregulations induced by the adult HF diet and perinatal HF environment were positively correlated and of the same order ($R = 0.74$; log-log) (Figure 8A).

Altogether these data identified a core of 23 miRNAs responsive to the HF adult diet or HF perinatal environment (Table 1). miRNA up-regulations ranged between 1.3 and 3-fold, and miRNA down-regulations, between 0.01 and 0.33. One miRNA expression appeared fully repressed and two, induced more than 10- and 100-fold, respectively.

miRNA expression misregulation under the adult environment HF

Progeny HFHF displayed differences in expression of 107 out of 545 miRNAs when compared to progeny HFC (Supplemental Table S2). 48 of these misregulations were also observed when comparing progeny HFC to progeny CC. Strikingly misregulations common to progeny HFHF and HFC were highly anti correlated ($R = -0.79$) (Figure 8B).

These data identified a core of 151 miRNAs the expression of which was specifically regulated by a perinatal HF environment, a core of 22 miRNAs the expression of which was

specifically regulated by a perinatal and adult HF environment, and a core of 59 miRNAs which expression depends on the match of the perinatal and adult metabolic environments.

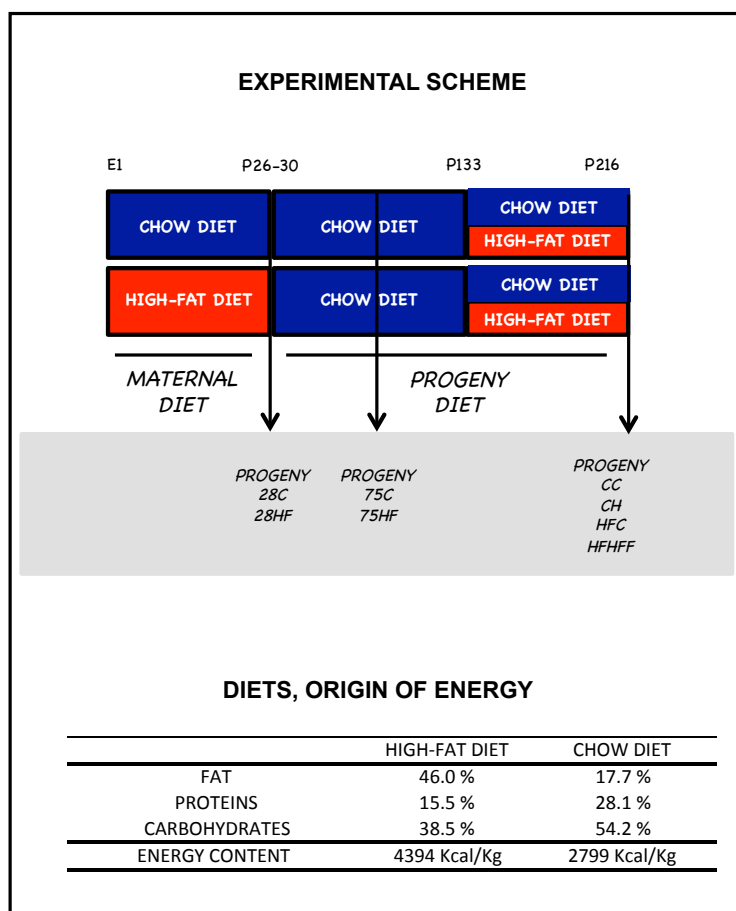


Figure 1 : Experimental scheme and diet composition.

Wistar females were fed a chow (C) or high-fat (HF) diet, moderate in protein and high in fat, from day 1 of gestation up till postnatal stage P28. Male pups were weaned on chow. Part of the C- and HF-progeny were sacrificed at P28 (Doubi-Kadmiri et al., manuscript submitted), P75 (2.5 months) or P216 (7 months). Part of each progeny was shifted to the HF diet at P133 (4.5 months) for 10 weeks. 6-7 individuals were used at each time point and for each progeny. Animals were euthanized after a 14-16 hours fasting night.

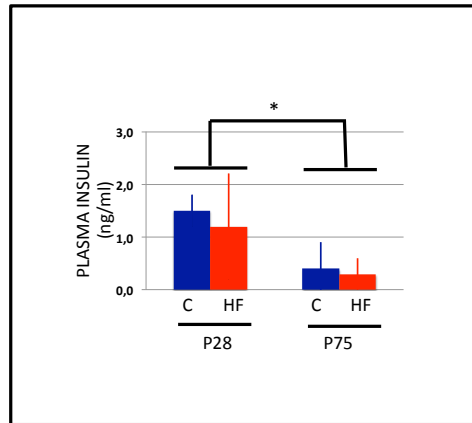


Figure 2 : Plasma insulin at weaning and in 2,5 month old progeny.

Perinatal diet does not impact plasma insulin in 2.5-months old progeny

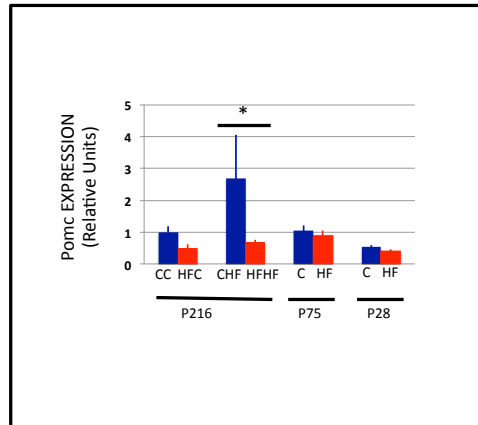


Figure 3 : Pomc expression at weaning and in 2,5 and 7 month old progeny

Perinatal diet does not impact POMC expression in 2.5-months old progeny.

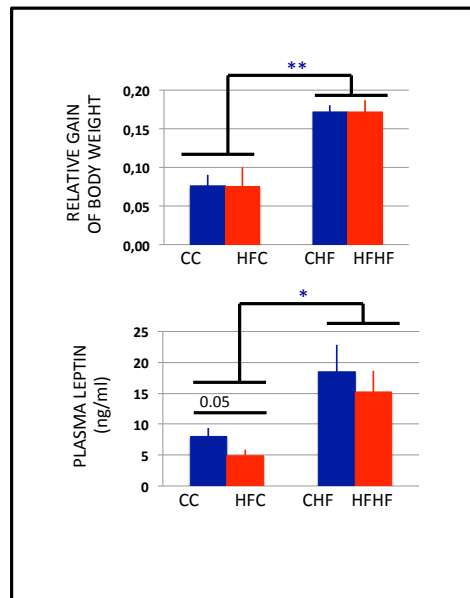


Figure 4 : Relative weight gain and plasma leptin in 7-months old progeny.

HF-progeny showed a tendency to lower plasma leptin (p-value = 0.056).

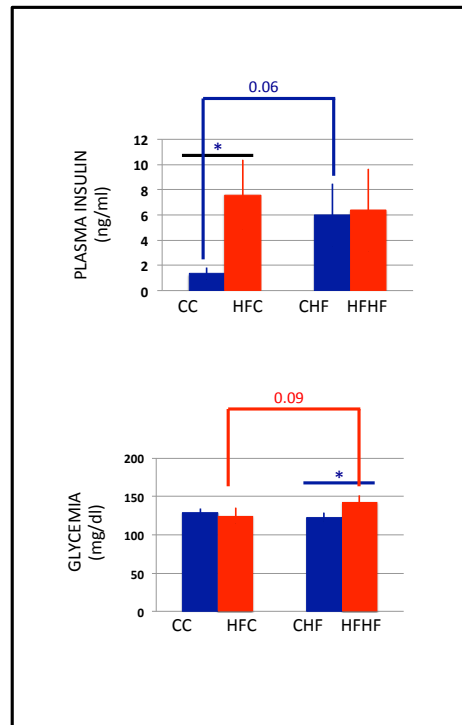


Figure 5 : Perinatal diet programs body glucose homeostasis in 7-months old progeny.

C- and HF-progeny display differences in plasma insulin when fed the C diet from weaning (p -value = 0.03). Both progeny displayed similar plasma insulin when fed the HF-diet for the last ten weeks (p -value = 0.46) while HF-progeny also displayed plasma hyperglycemia (p -value = 0.04).

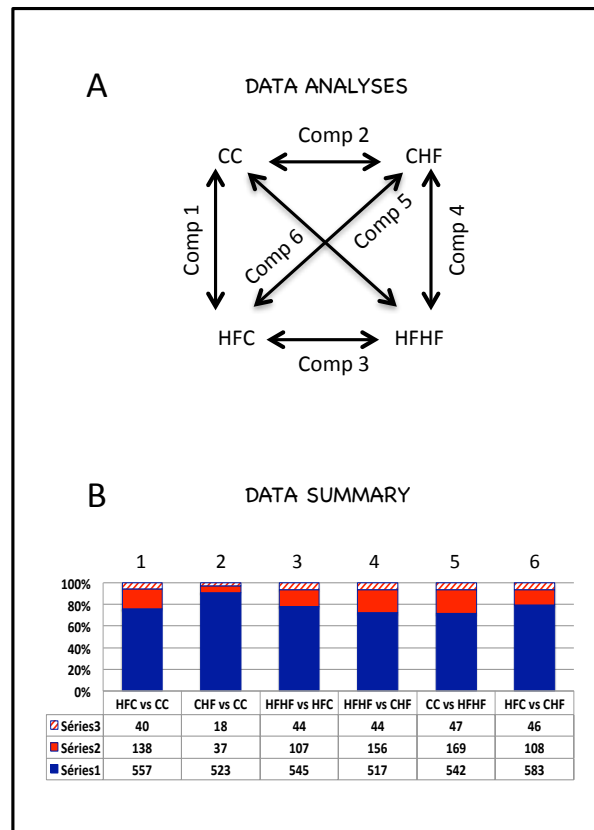


Figure 6 : miRNA expression profile analyses. (A) Six comparisons could be performed that are identified by numbers in further figures for easier identification. Ratios of miRNA expression between two progeny were calculated by using data from progeny closer to arrow heads as numerators (B) Ratio expression summary.

More than 500 miRNA expressions were compared. Blue bars denoted fractions of the miRNAs with similar expression, red bars denoted fractions of the miRNAs with significant differences in expression, hatched red bars denoted fractions of the miRNAs with significant differences of expression higher >3.0 (sum=100%).

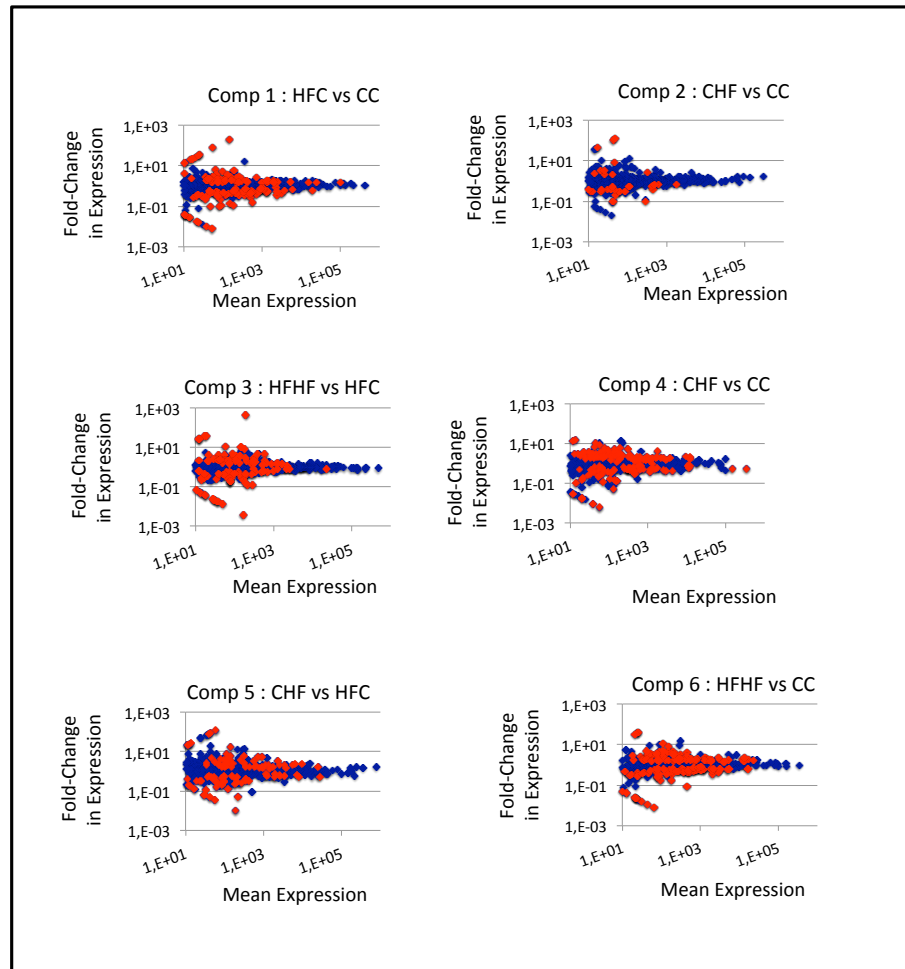


Figure 7 : Substantial changes in miRNA expression mark HF-progeny. Scatter plots depict fold-change in miRNA expression.

In each plot, the X-axis denotes mean normalized read counts, the Y-axis, fold changes in miRNA expression. Positive or negative values on the Y-axis denote up- or down-regulated miRNA expressions, respectively. X- and Y-axes are drawn using log₁₀ or log₂ scales, respectively. Blue dots denote miRNAs with no significant expression misregulation. Red dots denote miRNAs with significant expressions misregulation as identified by adj-p-values < 0.05. p-values were calculated with the Mann and Whitney test and adjusted for multiple testing using the method described in Benjamini and Yekutieli (2001).

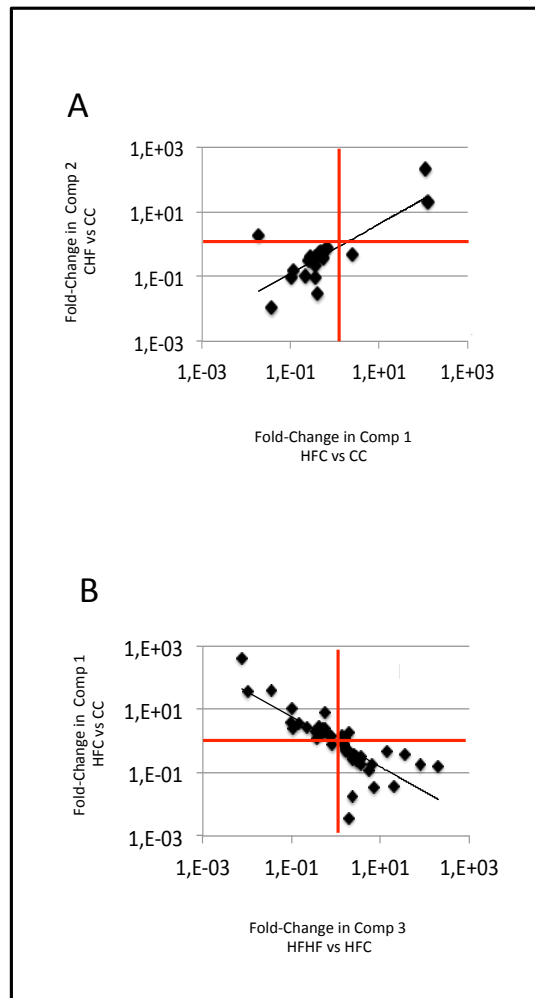
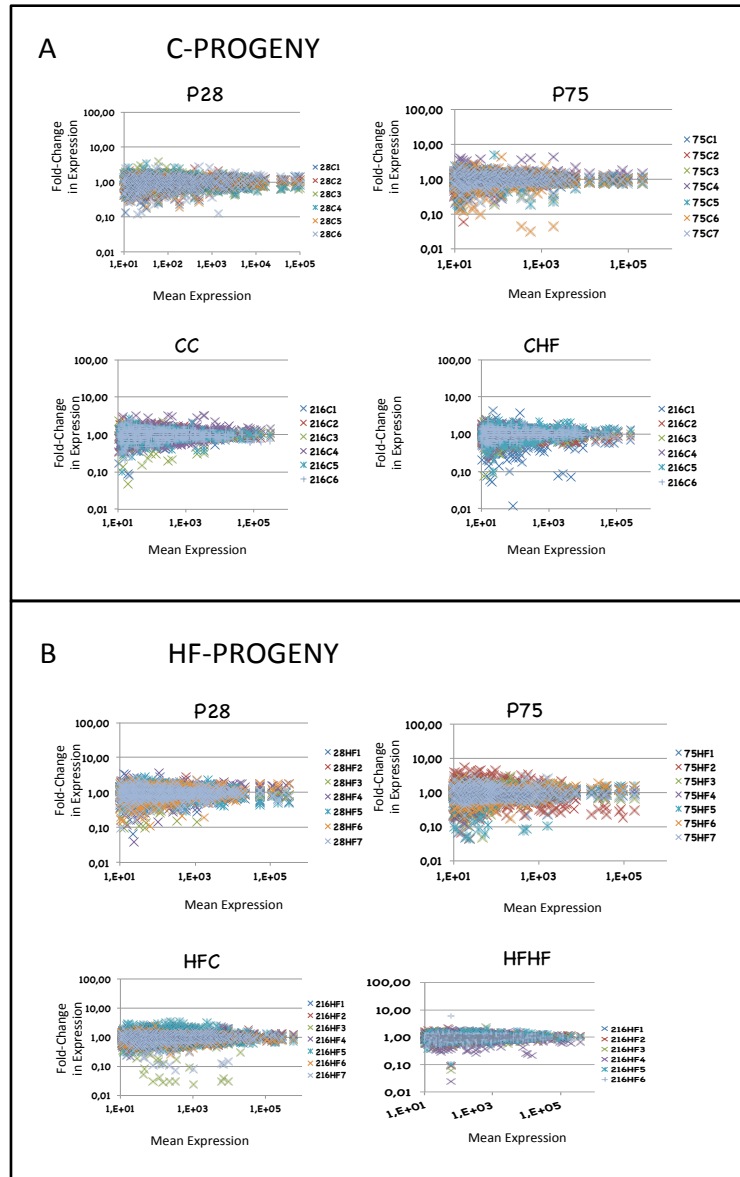


Figure 8 : Overlapping misregulation of miRNA expression. Fold-changes in miRNA expression were compared between comparisons 1 and 2 (A) or 1 and 3 (B) (see Figure 6A).



Supplemental Figure 1 : miRNA expression homogeneity across biological replicates. In C-progeny (A). In HF-progeny (B).

Plots depict miRNA relative expressions. Stages are indicated above each plot. In each plot, the X-axis denotes mean normalized read counts between 5-7 biological replicates, the Y-axis, fold changes of expression relatively to the mean expression. Only miRNAs identified by >10 reads are shown. X- and Y-axes are drawn using a log10 scale. Each dot represents the relative expression of an individual miRNA expression and each color, a biological replicate. Dots of positive or negative values on the Y-axis denote up- or down-regulated miRNA expressions relatively to mean expressions, respectively. For a given miRNA, values on the Y-axis close to 1 denote miRNAs of homogeneous expression. Note that many Y-values were distant from 1 for miRNAs of low mean expression. This accounted for the fact that the lower the mean expression, the less precise its quantification. (A) C-progeny (B) HF-progeny.

ETUDE IV

PROGRAMMATION METABOLIQUE PAR UN REGIME MATERNEL HYPERLIPIDIQUE EQUILIBRE EN PROTEINES

Au cours de l'étude III, nous avons observé que les descendance HF présentaient une croissance ralentie durant la période post-natale précoce. Dans le régime que nous avons utilisé riche en lipides et modéré en protéines l'apport énergétique lié aux protéines est de 15,5%. Ce taux est bien supérieur à celui des régimes hypo-protéiques mais tout de même relativement bas en comparaison avec le régime C (28,1%). Nous avons émis l'hypothèse que la croissance ralentie était la conséquence de la faible teneur protéique du régime HF. Nous avons testé cette hypothèse et défini un régime capable de tester indépendamment la réponse prédictive immédiate et la réponse prédictive adaptative de la descendance HF par rapport à la descendance C.

Nous avons reproduit l'étude II en y adjoignant un troisième régime contenant le même taux protéique que le régime C et le même taux lipidique que le régime HF (figure 1A). Le régime de l'étude II sera désigné HF1 et le nouveau régime HF2 (47%, 27% et 26% de l'apport énergétique provenant respectivement des lipides, protéines et carbohydrates). Nous avons utilisé un protocole similaire à l'étude précédente avec une variable, les régimes sont donnés en régime pré-gestationnel. Au cours de cette étude des rates de 12 semaines ont été nourries avec les régimes C, HF1 ou HF2 cinq semaines avant l'accouplement et durant les périodes de gestation et lactation.

I. Croissance post-natale

Les portées ont été pesées de manière hebdomadaire de P4 à P28. Les portées HF1 présentent une croissance ralentie (-30%, $p < 0,01$) durant la période post-natale précoce. Ce qui reproduit les résultats de l'étude II. Le régime HF2 corrige ce retard de croissance post-natale et montrent même un léger surpoids à partir de P21 (+5%, $p < 0,05$) (figure 2).

II. Programmation métabolique à court terme

Au sevrage une partie des descendances a été séparée et nourrie avec le régime C ou le régime HF1 durant 2 mois afin d'étudier la réponse prédictive immédiate à 4,5 mois (figure 1B). De P28 à P126 des pesées hebdomadaires ont été réalisées. L'insulinémie, la leptinémie et la glycémie ont été étudiées à 4,5 mois.

Par la suite, j'utiliserai la même terminologie que dans le chapitre II de mon introduction pour désigner la descendance. Le premier régime correspond au régime de la mère et le deuxième au régime de la descendance.

2.1. Poids des descendances juvéniles

Sous régime C, les descendances HF1 présentent un déficit de poids comparé aux descendances C qui s'atténue avec le temps pour ne s'élever qu'à 6% à P105 ($p < 0,05$). A P112, les descendances HF1 récupèrent un poids similaire aux descendances C (figure 3A). Les descendances HF2 présentent la même courbe de poids que les descendances C (figure 3A).

Sous régime HF1, les descendances HF1 présentent un déficit de poids comparé aux descendances C qui s'atténue avec le temps pour ne s'élever qu'à 5% à P119 ($p < 0,05$) et ne rester aucune différence significative à P126 (figure 3B). Les descendances HF2 présentent la même courbe de poids que les descendances C (figure 3B).

En conclusion, le régime maternel HF1 induit un déficit de poids corporel au sevrage qui disparaît durant la période juvénile. Le régime maternel HF2 ne montre pas d'impact sur la croissance pondérale des descendances. Quelque soit l'environnement périnatal, les courbes de croissance sous régime C et HF1 sont similaires.

2.2. Gain de poids relatif des descendances juvéniles

Nous avons ensuite observé le gain de poids relatif hebdomadaire en rapportant le poids du jour J au poids de sevrage.

Sous régime C et HF1, les descendances HF1 ont un gain de poids relatif significativement supérieur (+40 à 80%, $p < 0,05$) aux descendances C tandis que les descendances HF2 présentent un gain de poids relatif similaire aux descendances C (figure 4).

En conclusion, les descendants HF1 ont un gain de poids corporel plus important et un poids corporel plus faible que les descendances C. Ces descendances sont en train de rattraper leur déficit de poids.

2.3. Leptinémie des descendances juvéniles

Sous régime C, les descendances C, HF1 et HF2 présentent une leptinémie plasmatique similaire et un même poids à 4,5 mois (figures 5).

Sous régime HF1, les descendances C, HF1 et HF2 présentent également une leptinémie plasmatique similaire. Toutefois, les descendances HF1 montrent un poids légèrement mais significativement plus faible que les descendances C (-5%, $p < 0,05$) (figure 5).

A 4,5 mois, le régime maternel HF1 ne montre aucun impact sur la leptinémie de la descendance quelque soit leur régime de sevrage. Le régime HF1 induit une hyperleptinémie (+50%, $p < 0,001$) chez les trois descendances bien qu'ils aient un poids similaire sous régimes C et HF1.

2.4. Glycémie des descendances juvéniles

Sous régime C, les descendances HF1 sont hypoglycémiques ($p < 0,01$). Les descendances HF2 ne montrent aucune modification de leur glycémie (figure 6).

Sous régime HF1, les trois descendances présentent la même glycémie (figure 6).

A 4,5 mois, le régime maternel HF1 induit une hypoglycémie chez les descendances sevrées sous régime C. Le régime maternel HF2 ne présente aucun impact sur la glycémie des descendances quelque soit leur régime de sevrage. Le régime HF1 provoque une hypoglycémie chez les descendances C et HF2 ($p < 0,01$) (figure 6).

III. Programmation métabolique à long terme

Le régime maternel HF2 induit-il une programmation métabolique sur la descendance différente de celle du régime maternel HF1 ? Pour répondre à cette question, une partie des descendances a été sevrée sous régime C. A 5 mois, ces descendances ont été transférées sous régime HF2 ou maintenues sous régime C durant 2 mois (figure 1C). Des pesées hebdomadaires ont été réalisées de P140 à P196. A 7 mois, la leptinémie, l'insulinémie et la glycémie ont été étudiées.

3.1. Poids corporel des descendances adultes

Sous régime C, les descendances HF1 montrent une croissance ralentie. De P140 à P189, les descendances HF1 présentent entre 7 et 9% de différence avec les descendances C ($p < 0,05$). A partir de P196, cette différence disparaît (figure 7A). Les descendances HF2 ont un poids similaire aux descendances C.

Sous régime HF2, les trois descendances montrent le même poids.

La différence de poids observée à l'âge adulte entre les descendances HF1 et C, sous régime C, peut provenir d'une différence de poids présente avant le début de l'expérimentation. Le régime maternel HF2 ne montre aucun impact sur le poids des descendances adultes. Le régime HF2 adulte induit un surpoids chez les trois descendances.

3.2. Gain de poids relatif des descendance adultes

Sous régime C, les descendance HF1 présentent un gain de poids relatif significativement supérieur (+1,5 à 2 fois, $p < 0,05$) aux descendance C à partir de P168 (+1,5 à 2,6 fois $p < 0,05$). Les descendance HF2 ont un gain de poids relatif similaire aux descendance C (figure 8A).

Sous régime HF2, les descendance HF1 ont un gain de poids relatif significatif ponctuellement ; P154, P175 et P196 (+1,3 à 2,2, $p < 0,05$) (figure 8B). Les descendance HF2 ont un gain de poids similaire aux descendance C.

A l'âge adulte, le régime maternel HF1 provoque un gain de poids relatif sous régime C et ponctuellement sous régime HF2. Le régime maternel HF2 ne provoque aucun gain de poids relatif quelque soit leur régime alimentaire. Le régime HF2 adulte induit un gain de poids relatif significatif chez les trois descendance.

3.3. Leptinémie des descendance adultes

Sous régimes C et HF2, les trois descendance montrent un poids et une leptinémie similaires (figure 9).

A 7 mois, les régimes maternels HF1 et HF2 ne montrent pas d'impact sur la leptinémie de la descendance adulte. Le régime HF2 adulte induit un surpoids (+10%, $p < 0,05$) chez les descendance HF1 et HF2 et une tendance au surpoids chez les descendance C (+10%, $p = 0,052$). Ce surpoids est associé à une hyperleptinémie chez les trois descendance. Ceci atteste les propriétés obésogènes de ce régime.

3.4. Glycémie des descendances adultes

Sous régime C, les descendances HF1 et HF2 sont hypoglycémiques (-11%, $p < 0,001$ et -16%, $p < 0,05$ respectivement) (figure 10A).

Sous régime HF2, les trois descendances présentent une glycémie similaire (figure 10A).

A 7 mois, les régimes maternels HF1 et HF2 sont responsables d'une hypoglycémie lorsqu'ils sont sous régime C. Sous régime HF2, l'impact des régimes maternels est aboli.

Cette hypoglycémie est-elle corrélée à une modification d'insulinémie ?

3.5. insulinémie des descendances adultes

Sous régime C, les descendances HF1 ont tendance à une hyper-insulinémie (+2 fois, $p = 0,06$). Les descendances HF2 ne montrent pas de différence significative de leur insulinémie (figure 10B).

Sous régime HF2, les trois descendances montrent une insulinémie similaire (figure 10B).

A 7 mois, les régimes maternels HF1 et HF2 n'ont pas d'impact significatif sur l'insulinémie des descendances quelque soit leur régime alimentaire. Le régime HF2 induit une hyperinsulinémie chez les trois descendances sans modification de leur glycémie. Ceci suggère que le régime HF2 provoque une insulino-résistance chez les trois descendances.

En conclusion cette étude nous a permis de confirmer notre hypothèse. Le déficit de poids corporel de la descendance HF1 est causé par la faible teneur protéique de ce régime. Nous avons montré que le régime HF1 induisait chez la descendance juvénile une hypoglycémie sous régime C sans impact sous régime HF1. Le régime HF2 n'induit aucune programmation de la descendance juvénile. Sous régime HF2, les régimes maternels HF1 et

HF2 n'ont aucun impact sur les leptinémie et insuliniémie adultes cependant ces régimes provoquent une hypoglycémie.

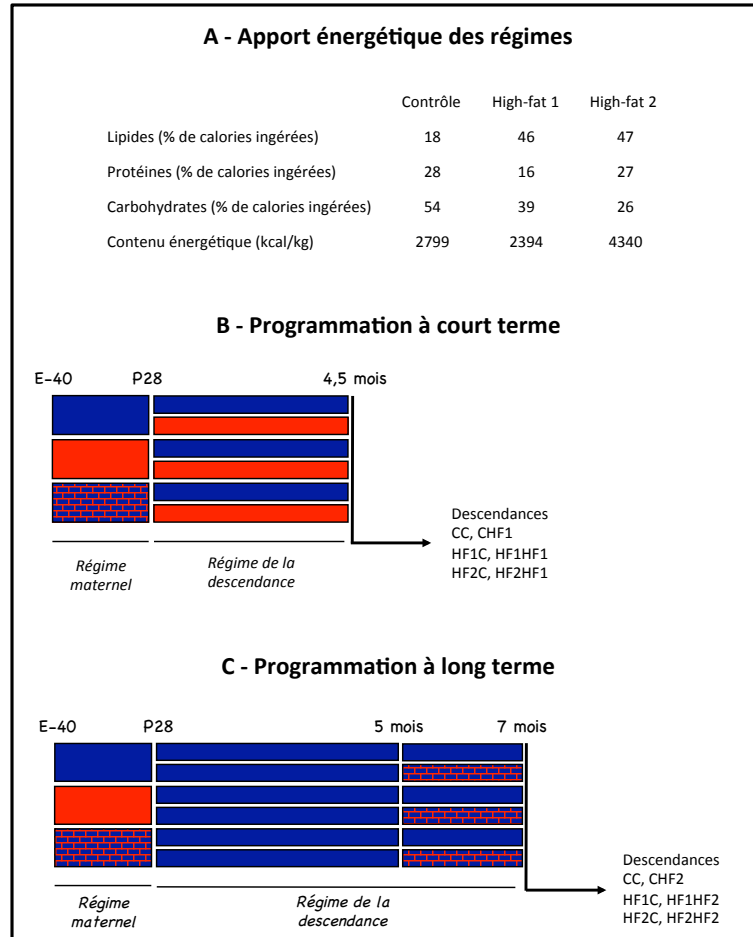


Figure 1 : Schéma expérimental.

A. Origine des apports énergétiques des régimes Contrôle ■, High-Fat 1 ■, High-Fat 2 ■. B. Analyse de la programmation à court terme. C. Analyse de la programmation à long terme.

Des femelles Wistar âgées de 6 semaines ont été nourries avec un régime spécifique 4 à 5 semaines avant accouplement et maintenues avec les mêmes régimes durant les périodes de gestation et lactation. Dans l'étude B, à 28 jours (P28) les descendances sont sevrées avec le régime C ou le régime HF1 et maintenues avec ces régimes durant 3,5 mois. Dans l'étude C, les descendances sont sevrées au régime C et nourris à partir de 5 mois avec le régime C ou HF2 durant 2 mois.

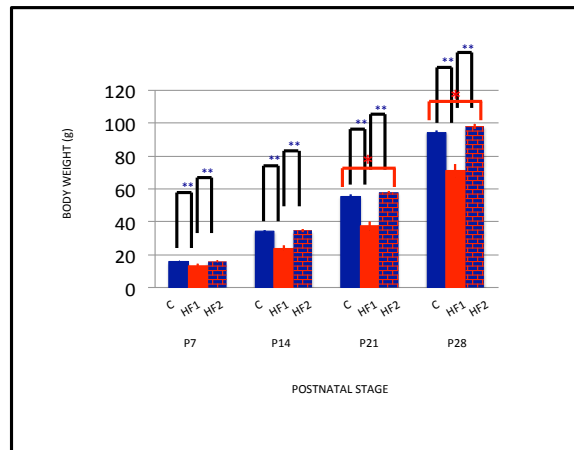


Figure 2 : Croissance post-natale.

L'analyse a été conduite sur les poids moyens des portées. Portées C : ■ n = 4 ; Portées HF1: ■ n = 6 ; Portées HF2: ■ n = 4. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne +/- sem. Le stade post-natal est reporté sur l'axe des X et le poids corporel sur l'axe des Y. Le rapport des poids moyens des portées C et HF1, HF2 et HF1, est de 0,8 dès le stade P7. Le rapport des poids moyens des portées C et HF2 est de 1,05 à partir du stade P21. *p<0,05, **p<0,01. C, contrôle, HF1, high-fat 1, HF2, high-fat 2.

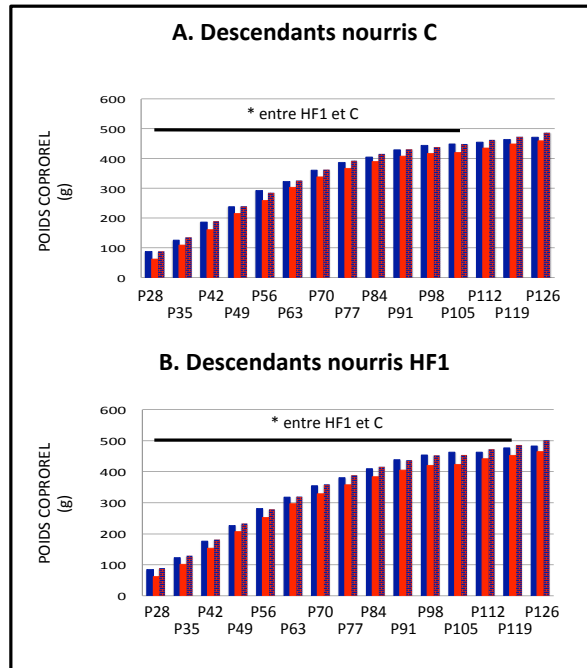


Figure 3 : Programmation à court-terme. Poids corporel des descendants C, HF1 et HF2 après le sevrage.

A. Poids corporel des descendance sous régime C. B. Poids corporel des descendance sous régime HF1.

*L'analyse a été conduite sur les poids individuels. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne +/- sem. A compter du sevrage (P28) les descendance C, HF1 et HF2 sont nourries avec le régime C ou HF1 durant 2 mois. n = 10. *p<0,05, **p<0,01.*

■ : C, contrôle, ■ : HF1, high-fat 1, ■ : HF2, high-fat 2

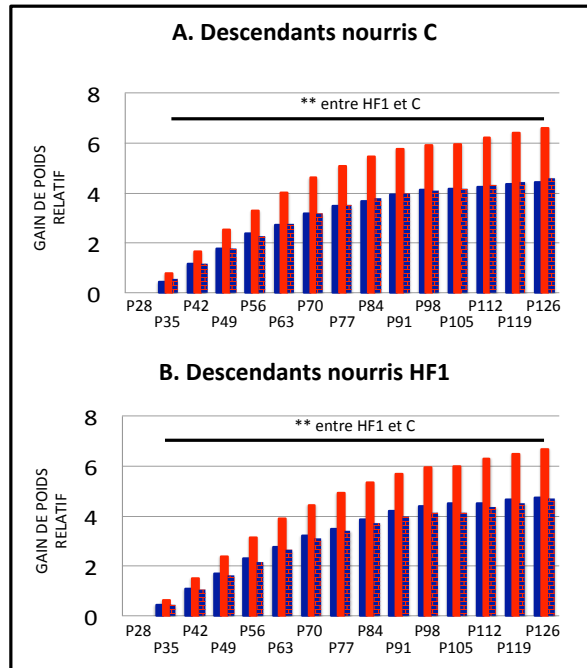


Figure 4 : Programmation à court-terme. Gain de poids relatifs des descendants C, HF1 et HF2 après le sevrage. A. Gain de poids relatif des descendances sous régime C. B. Gain de poids relatif des descendances sous HF1.

*L'analyse a été conduite sur les gains de poids relatifs individuels. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne +/- sem. A compter du sevrage (P28) les descendants C, HF1 et HF2 sont nourris avec le régime C ou HF1 durant 2 mois. n = 10. *p<0,05, **p<0,01.*

■ : C, contrôle, ■ : HF1, high-fat 1, ■ : HF2, high-fat 2

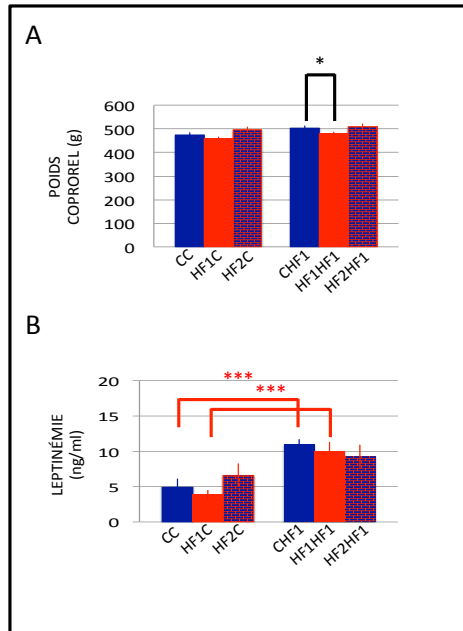


Figure 5 : Programmation à court-terme. Poids corporel et leptinémie plasmatique des descendants juvéniles. A. Poids corporel à 4,5 mois. B. Leptinémie plasmatique à 4,5 mois.

*L'analyse a été conduite sur les poids et leptinémies individuels. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne +/- sem. A compter du sevrage (P28) les descendance C, HF1 et HF2 sont nourries avec le régime C ou HF1 durant 2 mois. n = 10. *p<0,05, ***p<0,001.*

■ : C, contrôle, **■** : HF1, high-fat 1, **■** : HF2, high-fat 2

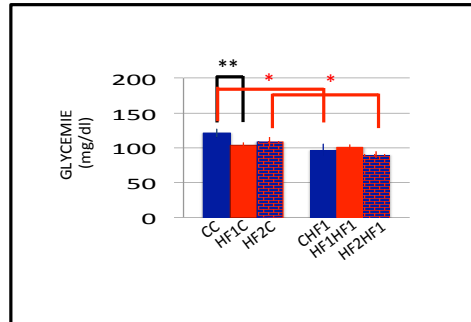


Figure 6 : Programmation à court-terme. Glycémie plasmatique des descendants juvéniles.

*L'analyse a été conduite sur les glycémies individuelles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne +/- sem. A compter du sevrage (P28) les descendance C, HF1 et HF2 sont nourries avec le régime C ou HF1 durant 2 mois. n = 10. *p<0,05, **p<0,01.*

■ : C, contrôle, ■ : HF1, high-fat 1, ■ : HF2, high-fat 2

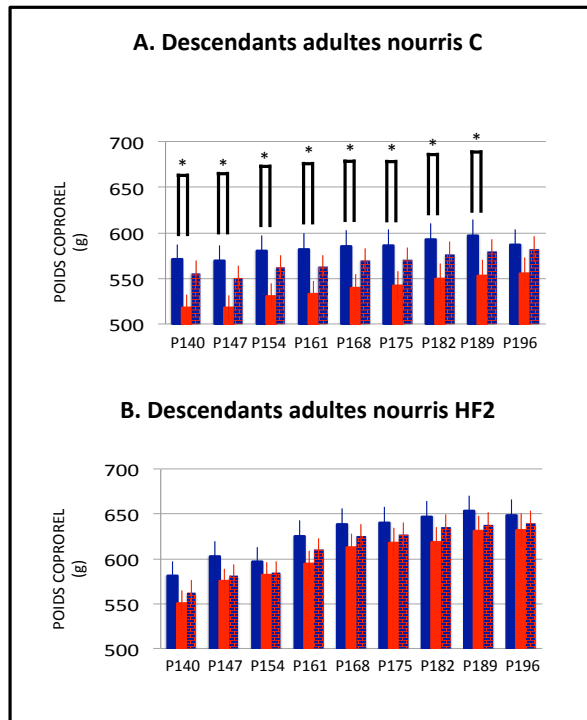


Figure 7 : Programation à long-terme. Poids corporel de la descendance adulte nourrie C ou HF2. A. Poids corporel des descendants C, HF1 et HF2 sous régime C. B. Poids corporel des descendance C, HF1 et HF2 sous régime HF2.

*L'analyse a été conduite sur les poids individuels. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne +/- sem. n = 10. *p<0,05.*

■: C, contrôle, ■: HF1, high-fat 1, ■: HF2, high-fat 2

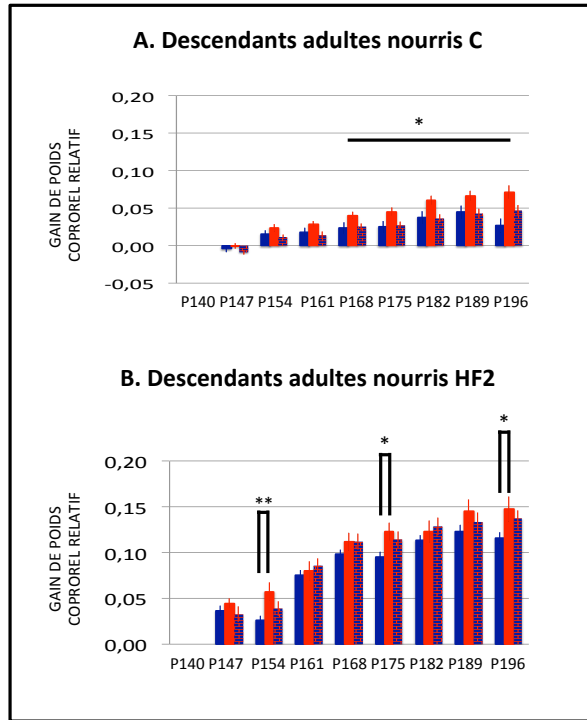


Figure 8 : Programmation à long-terme. Gain de poids relatif de la descendance adulte nourrie C ou HF2. A. Gain de poids relatif des descendances C, HF1 et HF2 sous régime C. B. Gain de poids relatif des descendances C, HF1 et HF2 sous régime HF2.

*L'analyse a été conduite sur les gain de poids individuels. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne +/- sem. n = 10. *p<0,05.*

■ : C, contrôle, ■ : HF1, high-fat 1, ■ : HF2, high-fat 2

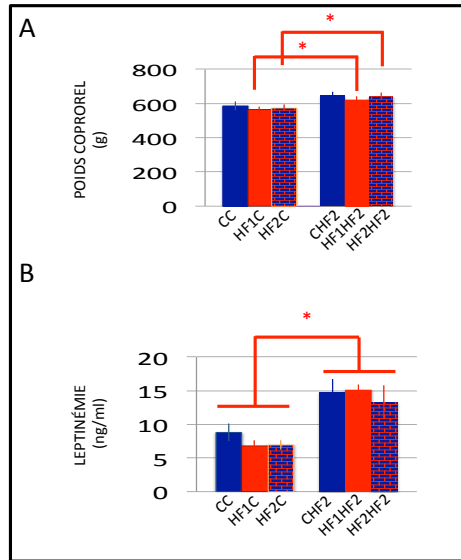


Figure 9 : Programmation à long-terme. Poids corporel et leptinémie plasmatique des descendances adultes. A. Poids corporel à 7 mois. B. Leptinémie plasmatique à 7 mois.

L'analyse a été conduite sur les poids et leptinémies individuels. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne +/- sem.

*n = 10.*p<0,05, ***p<0,001*

■: C, contrôle, **■**: HF1, high-fat 1, **■**: HF2, high-fat 2

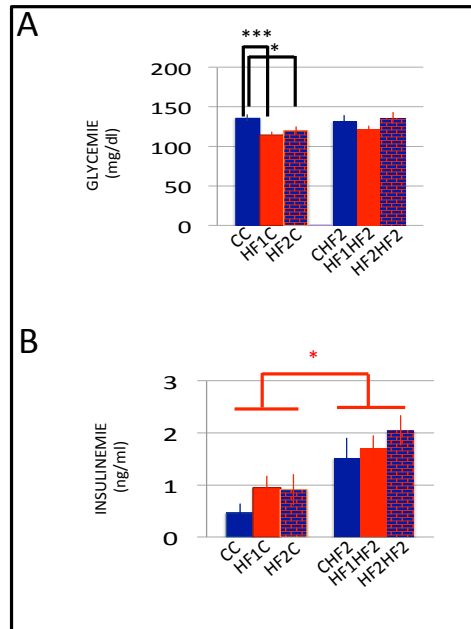


Figure 10 : Programmation à long-terme. Glycémie et insulinémie plasmatiques des descendants adultes. A. Glycémie à 7 mois. B. Insulinémie à 7 mois.

*L'analyse a été conduite sur les glycémies et insulinémies individuelles. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne +/- sem. n = 10. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.*

■ : C, contrôle, ■ : HF1, high-fat 1, ■ : HF2, high-fat 2

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

I. Régimes hyperlipidiques

Il est aujourd'hui clairement établi qu'il existe un lien entre l'environnement périnatal et la prédisposition à des maladies métaboliques à l'âge adulte. De nombreuses études expérimentales montrent que la nutrition maternelle modifie certains paramètres physiologiques et moléculaires de la mère façonnant l'environnement périnatal de la descendance. Les réponses affectant leur développement embryonnaire ou post-natal précoce constituent la réponse adaptative immédiate. Celles se manifestant après la période d'exposition à cet environnement résultent d'une réponse adaptative prédictive (Hanson et Gluckman, 2014).

Il est important de comprendre par quels mécanismes environnement métabolique et endocrinien périnatal peut être gardé en mémoire par l'organisme et affecter durablement l'expression de gènes dans les divers tissus. L'émergence des miARN il y a une vingtaine d'années et la compréhension de leur mécanisme d'action a permis de les proposer comme étant une partie de la réponse. Les miARN régulent, en effet, l'expression de centaines de gènes au sein d'une cellule. Par ailleurs, des études expérimentales ont identifié les miARN comme d'importants marqueurs des états physiologiques et physiopathologiques.

L'homéostasie énergétique définissant un équilibre entre les apports alimentaires et les dépenses énergétiques est régulée en partie par l'hypothalamus. Un des noyaux clés de ce contrôle est le noyau arqué. Ce dernier perçoit les variations de signaux périphériques telles que la variation des taux hormonaux comme la leptine transitant par le troisième ventricule. La leptine est une hormone neurotrophique jouant un rôle primordial dans la formation des réseaux neuronaux hypothalamiques durant la période post-natale précoce. L'altération de cette maturation pourrait avoir d'importants effets sur l'équilibre énergétique de la descendance.

Au cours de ma thèse, j'ai analysé l'impact de deux régimes HF. Le premier régime HF1 contient 46%, 16% et 39% des apports caloriques en provenance des lipides, protéines et carbohydrates. Ce régime a été étudié en régime pré-gestationnel de 4 semaines et en régime gestationnel ainsi que durant la période de lactation. Le deuxième régime HF2

contient 47%, 27% et 26% des apports caloriques en provenance des lipides, protéines et carbohydrates. Ce régime a été étudié en régime pré-gestationnel et durant la période de lactation. L'impact de ces deux régimes a été comparé à un régime C contenant 18%, 23% et 59% des apports caloriques en provenance des lipides, protéines et carbohydrates. J'ai utilisé les régimes HF1 et HF2 pour l'étude de certains paramètres physiologiques et le régime HF1 pour l'étude de la programmation d'expression des miARN chez la descendance.

1.1. Impact des régimes HF1 et HF2 sur la croissance post-natale

Le régime HF1 induit chez la descendance un déficit pondéral visible de P4 à P28, moment où les descendances ont été sevrées. Des déficits pondéraux similaires, d'environ 35% au sevrage, ont été obtenus dans d'autres études chez le rat. Ces études utilisent des régimes HF d'origine végétale, à base d'huile de palme ou de margarine (Koza et al., 2000, Férézou-Viala et al., 2007, Couvreur et al., 2011). Ce phénotype avait été imputé à l'origine végétale des lipides. Le régime HF2 quant à lui n'induit pas de différence de P4 à P21. A partir de P21 les descendances HF2 commencent même à présenter un léger surpoids de 5%. Les régimes HF1 et HF2 diffèrent par leur apport protéique (16% vs 27%) et leur apport en carbohydrates (39% vs 26%) mais contiennent le même apport lipidique (46%) d'origine animale (saindoux). Ces résultats suggèrent très fortement que le déficit pondéral de la descendance HF1 durant la période post-natale précoce tout comme celui de la descendance soumis à un régime végétal, est la conséquence de la faible teneur en protéines et/ou forte teneur en carbohydrates.

Plusieurs études montrent qu'un régime maternel gestationnel carencé en protéines (9% vs 20%) induit un déficit pondéral chez la descendance de la naissance (-13%) au sevrage (-28%) (Bellinger et al., 2006, Bautista et al., 2008, Zheng et al., 2015). Bien que notre régime HF1 ait une carence modérée en protéines comparé aux autres régimes fortement carencés (5% à 9% d'apport énergétique), il semble que ce soit cette carence modérée qui soit responsable du déficit pondéral que nous avons observé.

Lorsqu'un régime est restreint à la gestation, les descendances nées de mères dont le régime était carencé en protéines récupèrent le poids des descendances C au sevrage (Abuzgaia et al., 2015). L'ensemble de ces résultats met en évidence qu'un régime carencé

en protéines donné durant la lactation est responsable de la différence pondérale durant la période post-natale précoce. Les résultats que nous avons obtenus avec le régime HF2 confirment cette hypothèse.

Nous avons observé que le régime maternel HF1 modifiait la cinétique de leptine post-natale. Les descendance HF1 présentent notamment un effondrement des taux de leptinémie entre P8 et P14. Cette cinétique s'apparente à celle des descendance de mères soumises à une restriction calorique (Yura et al., 2005, Delahaye et al., 2008) et diffère de celle de la descendance HF dans l'étude de Masuyama et al. chez laquelle les taux plasmatiques de leptine sont augmentés. Cet effet est exacerbé lorsque le régime maternel est donné durant la période de lactation (Masuyama et al., 2014).

La leptine possède un rôle neurotrophique au niveau hypothalamique durant la période périnatale. Une restriction calorique durant la période gestationnelle modifie le taux de leptine plasmatique de la descendance et de ce fait induit des altérations d'expression des neuropeptides hypothalamiques et de l'organisation des circuits neuronaux hypothalamiques. Ces altérations se traduisent par une diminution d'expression de l'ARNm de POMC de P14 à P30 (Delahaye et al., 2008) et de la densité des fibres NPY, CART se projetant dans le NPV à l'âge adulte (Yura et al., 2005).

Ainsi l'effondrement du taux de leptine chez notre descendance HF1 peut avoir des conséquences sur la formation des réseaux neuronaux hypothalamiques et modifier la transmission des informations menant à long terme à une altération de la balance énergétique et des métabolismes glucidique et lipidique.

1.2. Réponse adaptative prédictive

Le déficit pondéral induit par le régime périnatal HF1 s'atténue avec le temps et s'élève à 6% à P105 puis disparaît à P126. Le régime périnatal HF2 quant à lui n'a pas d'impact sur la croissance pondérale des descendance.

A 4,5 mois, la descendance HF1 présente une hypoglycémie. Ces descendance ne montrent aucune altération de leur leptinémie. Le régime HF2 ne montre aucun impact sur ces deux paramètres plasmatiques.

A 7 mois, la descendance HF1 présente une altération de son homéostasie glucidique qui se traduit par une insulïnémie 5 fois supérieure et une normoglycémie. Le régime HF2 provoque une diminution de la glycémie de 11%, signe d'une meilleure tolérance au glucose.

Lorsque les descendances HF1 sont soumises au régime HF1 entre 4,5 et 7 mois, le régime maternel HF1 n'induit ni gain de poids relatif supérieur ni exacerbation de la leptinémie. Cependant, ce régime provoque une hyperglycémie chez les descendances HF, ce qui est le signe d'une insulino-résistance.

Nos résultats démontrent d'un régime HF carencé en protéines et/ou carbohydrates induit une insulino-résistance chez la descendance adulte. La question qui se pose est donc de savoir par quels mécanismes cette insulino-résistance se met-elle en place.

II. microARN

2.1. microARN et homéostasie énergétique

Il a été clairement démontré qu'au sein de l'hypothalamus l'expression de *Dicer* est régulée par le statut nutritionnel des individus (Schneeberger et al., 2012, Crépin et al., 2014). Une période de jeûne chez la souris induit une surexpression de *Dicer* dans l'hypothalamus (+11%) tandis que son expression est diminuée chez des souris obèses (DIO ou *ob/ob*, -40%).

Une délétion spécifique de *Dicer* dans les neurones POMC, conduit à une hyperphagie et une diminution des dépenses énergétiques (Schneeberger et al., 2012, Vinnikov et al., 2014).

Ces résultats démontrent que les miARN sont essentiels à l'activité des neurones POMC.

2.2. miARN et réponse adaptative immédiate

Les miARN contrôlent l'expression de centaines de gènes et sont de bons candidats à la transmission des stimuli perçus durant la période périnatale. Dans cette optique, nous avons étudié l'expression de plus de 500 miARN dans l'ARC/EM des descendances durant

les quatre premières semaines post-natales. Nous avons d'abord établi une cinétique d'expression de miARN chez la descendance C durant cette période. De P4 à P28, l'expression des miARN varie de 6 à 44%. Ces résultats démontrent la plasticité d'expression des miARN au cours du développement post-natal précoce, période au cours de laquelle se forment les réseaux neuronaux hypothalamiques.

Nous avons par la suite étudié la réponse adaptative immédiate induite par l'environnement périnatal HF1. Nous avons comparé les profils d'expression de miARN aux stades de développement P4, P8, P14, P21 et P28. Nous avons montré que le régime maternel HF induisait peu de modification d'expression, entre 1 et 7% des miARN voient leur expression varier. Ces résultats reflètent une robustesse des contrôles développementaux auxquels l'expression des miARN est soumise durant les premières semaines post-natales.

2.3. miARN et réponse adaptative prédictive

Durant la période juvénile (P75), le régime maternel HF1 ne montre aucun impact sur les profils d'expression de miARN de l'ARC. Cependant à l'âge adulte (P216), le régime maternel HF1 montre un impact important sur les profils d'expression, l'expression de 20 à 30% des miARN est modifiée. Nous avons identifié 138 miARN dont l'expression est modifiée par l'environnement périnatal HF1. Nous avons également identifié, chez la descendance C, 37 miARN dont l'expression est modifiée par un environnement HF1 adulte. L'expression de 22 de ces miARN est modifiée à la fois par un environnement HF1 périnatal et un environnement HF1 adulte. Nous observons une corrélation positive entre les modifications d'expression induites par un environnement HF1 périnatal et celles induites par un environnement HF1 adulte. Autrement dit, les miARN surexprimés par un environnement HF1 périnatal sont également surexprimés par un environnement HF1 adulte chez la descendance C. L'expression de 116 miARN (table 10) est programmée spécifiquement par l'environnement HF1 périnatal et l'expression de 15 miARN (table 11) est conditionnée spécifiquement par l'environnement HF1 adulte.

rno-let-7c-1-3p	rno-mir-221-5p	rno-mir-344b-1-3p	rno-mir-487b_hairp
rno-let-7e-3p	rno-mir-222-3p	rno-mir-344b-2-3p	rno-mir-490-3p
rno-let-7f-2_hairp	rno-mir-224-5p	rno-mir-344b-5p	rno-mir-493-3p
rno-let-7i-5p	rno-mir-23b_hairp	rno-mir-344g_hairp	rno-mir-493-5p
rno-mir-107-3p	rno-mir-26b-5p	rno-mir-345-3p	rno-mir-503-5p
rno-mir-1188-5p	rno-mir-28-5p	rno-mir-3544	rno-mir-505-3p
rno-mir-125a_hairp	rno-mir-296-5p	rno-mir-3544_hairp	rno-mir-505-5p
rno-mir-125b-2-3p	rno-mir-299a-5p	rno-mir-3547_hairp	rno-mir-539_hairp
rno-mir-132_hairp	rno-mir-29a_hairp	rno-mir-3557_hairp	rno-mir-539-3p
rno-mir-134_hairp	rno-mir-29a-5p	rno-mir-3585-5p	rno-mir-541-3p
rno-mir-134-3p	rno-mir-29b-2_hairp	rno-mir-3596b_hairp	rno-mir-543-3p
rno-mir-139_hairp	rno-mir-29b-2-5p	rno-mir-361_hairp	rno-mir-6215_hairp
rno-mir-140-5p	rno-mir-300-5p	rno-mir-365-3p	rno-mir-665
rno-mir-145-3p	rno-mir-3068_hairp	rno-mir-377-3p	rno-mir-671
rno-mir-148b-5p	rno-mir-3068-3p	rno-mir-379-3p	rno-mir-672-3p
rno-mir-151_hairp	rno-mir-3068-5p	rno-mir-380-5p	rno-mir-674_hairp
rno-mir-152-3p	rno-mir-30b-3p	rno-mir-381_hairp	rno-mir-708-5p
rno-mir-15b-3p	rno-mir-30c-2_hairp	rno-mir-409a_hairp	rno-mir-760-3p
rno-mir-17-1-3p	rno-mir-30c-5p	rno-mir-409a-3p	rno-mir-764-3p
rno-mir-17-5p	rno-mir-30e_hairp	rno-mir-409a-5p	rno-mir-770_hairp
rno-mir-1839-3p	rno-mir-322-3p	rno-mir-412-5p	rno-mir-770-3p
rno-mir-1843_hairp	rno-mir-323-3p	rno-mir-431	rno-mir-770-5p
rno-mir-1843-3p	rno-mir-323-5p	rno-mir-431_hairp	rno-mir-872-3p
rno-mir-185_hairp	rno-mir-324-5p	rno-mir-433-3p	rno-mir-873-3p
rno-mir-185-5p	rno-mir-329-3p	rno-mir-449a-5p	rno-mir-874-3p
rno-mir-187*	rno-mir-331-3p	rno-mir-455*	rno-mir-877_hairp
rno-mir-18a-5p	rno-mir-335_hairp	rno-mir-485_hairp	rno-mir-92a-3p
rno-mir-211-5p	rno-mir-338-5p	rno-mir-485-3p	rno-mir-92b_hairp
rno-mir-212-3p	rno-mir-339-3p	rno-mir-485*	rno-mir-935

Table 10 : MicroARN dont l'expression est spécifiquement programmée par l'environnement hyperlipidique périnatal HF1 dans l'ARC de la descendance âgée de 7 mois

rno-let-7b_hairp	rno-mir-200c_hairp	rno-mir-376a-5p
rno-mir-138-2-3p	rno-mir-298*	rno-mir-383_hairp
rno-mir-153-5p	rno-mir-331_hairp	rno-mir-412_hairp
rno-mir-186-5p	rno-mir-335	rno-mir-434_hairp
rno-mir-199a_hairp	rno-mir-340-3p	rno-mir-702-5p

Table 11 : MicroARN dont l'expression est conditionnée par l'environnement hyperlipidique HF1 de 10 semaines dans l'ARC de la descendance âgée de 7 mois

Par ailleurs, 48 des miARN dont l'expression est modifiée par un environnement périnatal HF1 est également modifiée lorsque que s'y ajoute un environnement HF1 à l'âge adulte. Ces 48 miARN montrent une expression anti-corrélée lorsque celle-ci est induite par l'environnement HF1 périnatal en comparaison avec l'environnement HF1 adulte. C'est-à-dire que l'association d'un environnement HF1 durant la période périnatale et à l'âge adulte rétabli une expression proche de celle de la descendance C. L'expression de 90 miARN (table 12) est programmée spécifiquement par l'environnement HF1 périnatal. Cette expression n'est pas modifiée lorsque la descendance est maintenue dans un environnement HF1 adulte. Par ailleurs, l'expression de 59 miARN (table 13) est conditionnée par l'association d'un environnement HF1 périnatal et adulte.

rno-let-7i-5p	rno-mir-212-3p	rno-mir-322-3p	rno-mir-377-3p	rno-mir-493-3p
rno-mir-107-3p	rno-mir-221-5p	rno-mir-322*	rno-mir-379-3p	rno-mir-501-3p
rno-mir-10a-5p	rno-mir-222-3p	rno-mir-323-3p	rno-mir-380-5p	rno-mir-505-3p
rno-mir-1188-5p	rno-mir-224-5p	rno-mir-323-5p	rno-mir-381_hairp	rno-mir-505-5p
rno-mir-125b-2-3p	rno-mir-26b-5p	rno-mir-324-5p	rno-mir-409a_hairp	rno-mir-539_hairp
rno-mir-134_hairp	rno-mir-28-5p	rno-mir-329-3p	rno-mir-409a-3p	rno-mir-539-3p
rno-mir-139_hairp	rno-mir-296-5p	rno-mir-344b-1-3p	rno-mir-409a-5p	rno-mir-671
rno-mir-140-5p	rno-mir-299a-5p	rno-mir-344b-2-3p	rno-mir-412-5p	rno-mir-672-3p
rno-mir-145-3p	rno-mir-29a_hairp	rno-mir-345-5p	rno-mir-425-5p	rno-mir-674_hairp
rno-mir-148b-5p	rno-mir-29a-5p	rno-mir-346_hairp	rno-mir-431	rno-mir-758-3p
rno-mir-152-3p	rno-mir-300-5p	rno-mir-3544	rno-mir-431_hairp	rno-mir-760-3p
rno-mir-15b-3p	rno-mir-301a-3p	rno-mir-3544_hairp	rno-mir-433-3p	rno-mir-770_hairp
rno-mir-16-5p	rno-mir-3068_hairp	rno-mir-3557_hairp	rno-mir-449a-5p	rno-mir-770-3p
rno-mir-17-5p	rno-mir-3068-3p	rno-mir-3585-5p	rno-mir-455*	rno-mir-770-5p
rno-mir-1839-3p	rno-mir-3068-5p	rno-mir-3596b_hairp	rno-mir-485_hairp	rno-mir-873-3p
rno-mir-185-5p	rno-mir-30b-3p	rno-mir-361_hairp	rno-mir-485-3p	rno-mir-92a-3p
rno-mir-187*	rno-mir-30c-2_hairp	rno-mir-365-3p	rno-mir-485*	rno-mir-92b_hairp
rno-mir-18a-5p	rno-mir-30c-5p	rno-mir-376a_hairp	rno-mir-490-3p	rno-mir-9a-3_hairp

Table 12 : MicroARN dont l'expression est programmée par l'environnement hyperlipidique périnatal HF1 dans l'ARC de la descendance HF1 âgée de 7 mois

rno-mir-1193_hairp	rno-mir-199a_hairp	rno-mir-328b_hairp	rno-mir-541_hairp
rno-mir-1193-3p	rno-mir-19b-3p	rno-mir-33-5p	rno-mir-582-3p
rno-mir-1249	rno-mir-22-5p	rno-mir-331_hairp	rno-mir-6322_hairp
rno-mir-125b-2_hairp	rno-mir-25-3p	rno-mir-341_hairp	rno-mir-6324
rno-mir-135b-5p	rno-mir-25-5p	rno-mir-3557-3p	rno-mir-652_hairp
rno-mir-137-5p	rno-mir-27a-5p	rno-mir-3559-5p	rno-mir-652-5p
rno-mir-146b-5p	rno-mir-298*	rno-mir-370_hairp	rno-mir-666-3p
rno-mir-150_hairp	rno-mir-299a_hairp	rno-mir-370-5p	rno-mir-671_hairp
rno-mir-150-3p	rno-mir-299a-3p	rno-mir-376c-3p	rno-mir-708-3p
rno-mir-150-5p	rno-mir-29b-1_hairp	rno-mir-378a-5p	rno-mir-770*
rno-mir-1839_hairp	rno-mir-29c_hairp	rno-mir-383-5p	rno-mir-7a-2-3p
rno-mir-1839-5p	rno-mir-29c-5p	rno-mir-411-3p	rno-mir-877
rno-mir-187-5p	rno-mir-3085_hairp	rno-mir-434_hairp	rno-mir-93-3p
rno-mir-191a_hairp	rno-mir-326-3p	rno-mir-466c-5p	rno-mir-99b_hairp
rno-mir-191a-3p	rno-mir-328a_hairp	rno-mir-511-3p	

Table 13 : MicroARN dont l'expression est conditionnée par l'environnement hyperlipidique de 10 semaines dans l'ARC de la descendance HF1 âgée de 7 mois

2.4. Origine des lipides

L'équipe de Casas-Agustench a récemment étudié, dans le foie de rat, l'effet de différents acides gras (huile d'olive, huile de poisson ou huile de palme, 10%) donnés durant les douze premiers jours de gestation sur l'expression de miARN chez la mère et sa descendance (Casas-Agustench et al., 2015). Ces régimes affectent l'expression des miARN des nouveau-nés et des adultes de 12 mois. L'expression des miR-192-5p, miR-10b-5p, miR-377-3p et miR-215 est augmentée chez les descendances adultes après un régime maternel à base d'huile de poisson en comparaison avec les régimes à l'huile de palme et huile d'olive. Celle des miR-26b-5p et miR-21-5p augmente en comparaison avec le régime à base d'huile de palme.

Parmi ces 6 miARN, le régime périnatal HF1 induit une surexpression de miR-26b-5p dans l'ARC de la descendance adulte sous régime C (+50%, $p < 0,05$) et de miR-377-3p sous régime C (+40%, $p < 0,01$) et sous régime HF1 (+90%, $p < 0,05$). miR-10b-5p n'est pas exprimé dans l'ARC, et l'expression des miR-192-5p et miR-215 n'est pas affectée par le régime maternel HF1.

Nos résultats associés aux résultats de cette équipe démontrent d'une part que l'expression des miARN est tissu-dépendante et que l'expression des miR-377-3p et miR-

26b-5p, est sensible aux régimes hyperlipidiques d'origine porcine (saindoux) ou marine, dans l'ARC et dans le foie.

Une étude très récente a cherché à observer l'impact des miARN dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. L'expression de miR-383, miR-384-3p et miR-488 a été identifiée dans les neurones POMC de souris âgées de 12 à 16 semaines. Cette étude montre également que les souris *ob/ob* et *db/db* présentent une augmentation d'expression de ces 3 miARN (+400%, +101% et +605% respectivement). En revanche, une administration centrale ou ip de leptine diminue leur niveau d'expression (-25%, -21% et -58% respectivement (Derghal et al., 2015).

Dans notre étude, nous avons observé une diminution d'expression de miR-383-5p dans l'ARC de la descendance adulte (-30%, $p < 0,05$) induite par l'association d'un environnement HF1 périnatal et adulte. Nous n'avons observé aucune modification d'expression des miR-384-3p et 488 dans nos profils d'ARC.

Une autre étude a montré un lien entre miARN et régulation de l'homéostasie énergétique. Cette étude montre une forte expression de miR-24 dans l'hypothalamus de souris (Sangiao-Alvarellos et al., 2014). Nous avons également montré que l'association d'un environnement HF1 périnatal et adulte induit une augmentation d'expression de ce miARN dans l'ARC de la descendance adulte (+370%, $p < 0,05$).

miR-24 agit sur le niveau d'ARNm et de protéines de l'OXT (Choi et al., 2013). Par ailleurs, une étude de culture cellulaire *in vitro* chez le bovin a observé qu'une surexpression de miR-24 dans le milieu de culture altérait le développement embryonnaire (Kropp et al., 2015).

Ces résultats suggèrent dans un premier temps que la modification d'expression des miARN durant la période périnatale a un impact sur le développement embryonnaire et dans un second temps que certains miARN pourraient avoir un rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et plus particulièrement de la prise alimentaire via la régulation d'expression de neuropeptides hypothalamiques. Dans notre cas, l'association de notre régime HF durant la période périnatale et adulte induit une surexpression de miR-24 qui pourrait induire une diminution d'expression d'OXT dans le NPV.

2.5. Statut nutritionnel de l'individu et régime hyperlipidique

Le statut métabolique/endocrinien de l'individu a également un impact sur le profil d'expression de miARN. Une étude récente menée chez le rat a observé les profils d'expression de 641 miARN hypothalamiques par la technologie de microarray dans deux conditions nutritionnelles, sous régime hyperlipidique ou sous restriction alimentaire. 23% des miARN ont une expression modifiée par le statut nutritionnel. 6 à 10 miARN appartiennent à la famille miR-30, 4 à 5 membres à la famille miR-200 et de nombreux miARN à la famille let-7. L'expression des miARN let-7a, miR-9, miR-30b, miR-100a et miR-145 n'augmente qu'avec le régime HF. L'expression des miARN miR-29a, miR-30e, miR-323-3p, miR-374-5p n'augmente que sous restriction alimentaire (Sangiao-Alvarellos et al., 2014).

En comparaison avec notre étude, nous avons observé que miR-100a n'était pas exprimé dans l'ARC. Chez la descendance adulte, notre régime HF1 n'affecte pas l'expression de let-7a, miR-30b et miR-145. Il induit cependant une sous-expression de miR-9 (-70%, $p < 0,05$). Le régime maternel HF1 n'affecte pas l'expression de miR-9 et n'affecte pas l'expression de let-7a sous régime C par contre induit une sous-expression de ce dernier sous régime HF1 (-50%, $p < 0,05$). Il induit une surexpression des miARN miR-30b (+110% sous régime C et +90% sous régime HF1, $p < 0,05$) et miR-145 (+160% sous régime C et +500% sous régime HF1, $p < 0,05$).

Cette étude diffère de la nôtre sur plusieurs points cruciaux. Sangiao-Alvarellos et al. analysent l'hypothalamus entier contrairement à nous qui étudions le profil d'expression de miARN dans l'ARC (qui représente environ 1/15 de l'hypothalamus). D'autre part, nous n'utilisons pas les mêmes outils statistiques pour définir les différences d'expression, Sangiao-Alvarellos et al. utilisent la p-value pour étudier 300 expressions. Nous avons utilisé la p-adjusted value (qui prend en compte le taux d'erreur se manifestant dans le cadre de comparaisons multiples). Notons que malgré ces différences nos données ainsi que les leurs se trouvent dans le même ordre de grandeur lorsque l'on se reporte à l'intervalle de confiance pour les miARN dont l'expression a été confirmée par RT-qPCR.

Notre étude met en évidence la différence de profils caractérisant les profils de l'ARC et de l'hypothalamus.

Notre étude associée à l'étude de Sangiao-Alvarellos et al. montre que le statut métabolique/endocrinien de l'individu influence le profil d'expression des miARN au niveau hypothalamique et plus spécifiquement au niveau de l'ARC.

2.5.1. microARN et métabolisme glucidique

Le miARN let-7 a été observé comme pouvant participer à la régulation du métabolisme glucidique (Zhu et al., 2011). Les souris surexprimant let-7 sont insulino-résistantes et intolérantes au glucose. Ces désordres sont dus à une inhibition de protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline. A l'inverse les souris chez qui la biosynthèse de let-7 a été bloquée montrent une meilleure tolérance au glucose et sensibilité à l'insuline lorsqu'elles sont nourries avec un régime obésogène.

Nos résultats associés aux résultats que j'ai présenté précédemment démontrent qu'il existe un lien entre les miARN et l'homéostasie énergétique. Nos résultats montrent que l'expression des miARN est conditionnée par les environnements alimentaires périnataux et adultes.

L'équipe de Vogt a montré qu'un environnement HF durant la période de lactation altère les projections axonales des neurones POMC de l'ARC vers le NPV postérieur chez la descendance adulte (Vogt et al., 2014). Cette région du NPV contient des neurones du système autonome qui innervent le pancréas. Ainsi une altération de la projection des neurones de l'ARC vers le NPV postérieur mène à une diminution de l'innervation des cellules β -pancréatiques et donc de la sécrétion d'insuline. Ces résultats suggèrent que les modifications d'expression des miARN que nous avons observées dans l'ARC de la descendance adulte HF1 peut entraîner une altération fonctionnelle des neurones du NPV en conséquence une altération de la sécrétion d'insuline et donc du métabolisme glucidique.

Nos résultats associés aux résultats de Vogt suggèrent que les différences d'expression de miARN pourraient donc être responsables de l'altération des homéostasies énergétique et glucidique.

CONCLUSION

Ces travaux de Thèse ont permis de montrer qu'un environnement périnatal hyperlipidique impacte faiblement l'expression des miARN de l'ARC/EM durant la période post-natale précoce bien qu'impactant fortement la croissance et la cinétique de leptine plasmatique. Les profils d'expressions chez les descendance C et HF1 montrent une cinétique similaire.

Nous avons également montré que l'environnement périnatal HF1 induisait une programmation à long terme du métabolisme glucidique des descendance adultes identifié par une insulino-résistance. L'expression de 138 miARN de l'ARC de la descendance de 7 mois reflète l'environnement périnatal. L'expression de 22 de ces miARN est également conditionnée par un environnement HF1 adulte chez la descendance C. Par ailleurs, 48 de ces miARN retrouvent une expression « normale » lorsque la descendance HF1 est soumise au régime HF1 à l'âge adulte. Autrement dit, la concordance de l'environnement périnatal avec l'environnement adulte rétabli une expression « normale ». Nos résultats démontrent une programmation de l'expression d'une grande partie des microARN exprimés dans l'ARC résultant d'une interaction entre l'environnement métabolique/endocrinien périnatal HF, l'âge et le régime métabolique/endocrinien adulte.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abuzgaia AM, Hardy DB, Arany E. (2015). Regulation of postnatal pancreatic Pdx1 and downstream target genes after gestational exposure to protein restriction in rats. *Reproduction*. 149(3):293-303.

Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest*. 101(5):1020-7.

Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, Flier JS. (1999). Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology*. 140(6):2755-62.

Ahima RS. and Flier JS. (2000). Leptin. *Annu. Rev. Physiol*. 62:413–37.

Alba M, Salvatori R. (2004). A mouse with targeted ablation of the growth hormone-releasing hormone gene: a new model of isolated growth hormone deficiency. *Endocrinology*. 145(9):4134-43.

Allison MB, Myers MG Jr. (2014). 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *J Endocrinol*. 223(1):T25-35.

Anderson WF, Killos L, Sanders-Haigh L, Kretschmer PJ, Diacumakos EG. (1980). Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(9):5399-403.

Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci*. 351-5.

Aréchiga-Ceballos F, Alvarez-Salas E, Matamoros-Trejo G, Amaya MI, García-Luna C, de Gortari P. (2014). Pro-TRH and pro-CRF expression in paraventricular nucleus of small litter-reared fasted adult rats. *J Endocrinol*. 221(1):77-88.

Arletti R, Benelli A, Bertolini A. (1989). Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides*. 10(1):89-93.

Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. (2004). Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals?. *J Physiol.* 561(Pt 2):355-77.

Arvey A, Larsson E, Sander C, Leslie CS, Marks DS. (2010). Target mRNA abundance dilutes microRNA and siRNA activity. *Mol Syst Biol.* 6:363.

B

Backholer K, Smith JT, Rao A, Pereira A, Iqbal J, Ogawa S, Li Q, Clarke IJ. (2010). Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology.* 151(5):2233-43.

Bagdade JD, Bierman EL, Porte D Jr. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest.* 46(10):1549-57.

Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prévot V. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* 19(2):293-301.

Balland E, Cowley MA2. (2015). New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Front Neuroendocrinol.* S0091-3022(15)30007-8.

Banks WA, Jaspan JB, Huang W, Kastin AJ. (1997). Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides.* 18(9):1423-9.

Barde YA. (1994). Neurotrophins: a family of proteins supporting the survival of neurons. *Prog Clin Biol Res.* 390:45-56.

Baribeau DA, Anagnostou E2. (2015). Oxytocin and vasopressin: linking pituitary neuropeptides and their receptors to social neurocircuits. *Front Neurosci.* 9:335.

Barker DJ. (1995). Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 311(6998):171-4.

- Barker DJ. (1999). Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med.* 31 Suppl 1:3-6.
- Bartel DP. (2004). MicroRNAs: Genomics, Review Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 281–297.
- Bartel DP. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 136(2):215-33.
- Baura GD, Foster DM, Porte D Jr, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest.* 92(4):1824-30.
- Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. (2008). Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res.* 63(4):358-63.
- Beale KE, Kinsey-Jones JS, Gardiner JV, Harrison EK, Thompson EL, Hu MH, Sleeth ML, Sam AH, Greenwood HC, McGavigan AK, Dhillon WS, Mora JM, Li XF, Franks S, Bloom SR, O'Byrne KT, Murphy KG. (2013). The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female rats. *Endocrinology.* 155(3):1091-8.
- Bellinger L, Sculley DV, Langley-Evans SC. (2006). Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. *Int J Obes (Lond).* 30(5):729-38.
- Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci.* 22(20):9048-52.
- Bereiter DA, Jeanrenaud B. (1979). Altered neuroanatomical organization in the central nervous system of the genetically obese (ob/ob) mouse. *Brain Res.* 165(2):249-60.
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell.* 28(2):328-36.

- Berglund ED, Li CY, Poffenberger G, Ayala JE, Fueger PT, Willis SE, Jewell MM, Powers AC, Wasserman DH. (2008). Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes*. 57(7):1790-9.
- Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH. (2001). A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 281(1):R254-60.
- Bi S, Robinson BM, Moran TH. (2003). Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285(5):R1030-6.
- Bi S. (2007). Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in energy homeostasis. *Peptides*. 28(2):352-6.
- Bi S, Kim YJ, Zheng F. (2012). Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides*. 46(6):309-14.
- Bi S. (2013). Dorsomedial hypothalamic NPY modulation of adiposity and thermogenesis. *Physiol Behav*. 121:56-60.
- Blanchette M, Daneman R. (2015). Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev*. pii: S0925-4773(15)30009-5.
- Blouet C, Schwartz GJ. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res*. 209(1):1-12.
- Bolborea M, Dale N. (2013). Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci*. 36(2):91-100.
- Bolton JL, Bilbo SD. (2014). Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. *Dialogues Clin Neurosci*. 16(3):307-20.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. (2004a). Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*. 24(11):2797-805.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. (2004b). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*. 304(5667):108-10.

- Bouret SG, Simerly RB. (2004c). Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology*. 145(6):2621-6.
- Bouret SG. (2010). Neurodevelopmental actions of leptin. *Brain Res*. 1350:2-9.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 3(3):e85.
- Broberger C. (2005). Brain regulation of food intake and appetite : molecules and networks. *J Intern Med*. 258(4):301-27.
- Brown JA, Woodworth HL, Leininger GM. (2015). To ingest or rest? Specialized roles of lateral hypothalamic area neurons in coordinating energy balance. *Front Syst Neurosci*. 9:9.
- Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, Bateman AC, Clough GF, Poston L, Hanson MA, McConnell JM, Byrne CD. (2009). Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology*. 50(6):1796-808.
- Buckley AJ, Keserü B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. (2005). Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism*. 54(4):500-7.
- Büdefeld T, Tobet SA, Majdic G. (2011). Altered position of cell bodies and fibers in the ventromedial region in SF-1 knockout mice. *Exp Neurol*. 232(2):176-84.
- Burgueño AL, Cabrerizo R, Gonzales Mansilla N, Sookoian S, Pirola CJ. (2013). Maternal high-fat intake during pregnancy programs metabolic-syndrome-related phenotypes through liver mitochondrial DNA copy number and transcriptional activity of liver PPARGC1A. *J Nutr Biochem*. 24(1):6-13.
- Buwalda B, Van Kalkeren AA, de Boer SF, Koolhaas JM. (1998). Behavioral and physiological consequences of repeated daily intracerebroventricular injection of corticotropin-releasing factor in the rat. *Psychoneuroendocrinology*. 23(3):205-18.

C

Caron E, Sachot C, Prevot V, Bouret SG. (2010). Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 518(4):459-76.

Casas-Agustench P, Fernandes FS, Tavares do Carmo MG, Visioli F, Herrera E, Dávalos A. (2015). Consumption of distinct dietary lipids during early pregnancy differentially modulates the expression of microRNAs in mothers and offspring. *PLoS One.* 10(2):e0117858.

Cerf ME, Williams K, Nkomo XI, Muller CJ, Du Toit DF, Louw J, Wolfe-Coote SA. (2005). Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288(5):R1122-8.

Cerf ME, Muller CJ, Du Toit DF, Louw J, Wolfe-Coote SA. (2006). Hyperglycaemia and reduced glucokinase expression in weanling offspring from dams maintained on a high-fat diet. *Br J Nutr.* 95(2):391-6.

Cerf ME, Chapman CS, Muller CJ, Louw J. (2009). Gestational high-fat programming impairs insulin release and reduces Pdx-1 and glucokinase immunoreactivity in neonatal Wistar rats. *Metabolism.* 58(12):1787-92.

Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci.* 28(46):12107-19.

Chao PT, Yang L, Aja S, Moran TH, Bi S. (2011). Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. *Cell. Metab.* 13(5):573-83.

Chee MJ, Pissios P, Maratos-Flier E. (2013). Neurochemical characterization of neurons expressing melanin-concentrating hormone receptor 1 in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol.* 521(10):2208-34.

- Chee MJ, Pissios P, Prasad D, Maratos-Flier E. (2014). Expression of melanin-concentrating hormone receptor 2 protects against diet-induced obesity in male mice. *Endocrinology*. 155(1):81-8.
- Chen A, Perrin M, Brar B, Li C, Jamieson P, Digruccio M, Lewis K, Vale W. (2005). Mouse corticotropin-releasing factor receptor type 2alpha gene: isolation, distribution, pharmacological characterization and regulation by stress and glucocorticoids. *Mol Endocrinol*. 19(2):441-58.
- Chen H, Simar D, Lambert K, Mercier J, Morris MJ. (2008). Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology*. 149(11):5348-56.
- Chen H, Morris MJ. (2009). Differential responses of orexigenic neuropeptides to fasting in offspring of obese mothers. *Obesity (Silver Spring)*. 17(7):1356-62.
- Chen H, Simar D, Morris MJ. (2009). Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *PLoS One*. 4(7):e6259.
- Chen H, Simar D, Morris MJ. (2014). Maternal obesity impairs brain glucose metabolism and neural response to hyperglycemia in male rat offspring. *J Neurochem*. 129(2):297-303.
- Chen JS, Revilla AC, Guerrero M, Gumbayan AM, Zeller RW. (2015). Properties and kinetics of microRNA regulation through canonical seed sites. *J RNAi Gene Silencing*. 11:507-14.
- Chen X, Gao C, Li H, Huang L, Sun Q, Dong Y, Tian C, Gao S, Dong H, Guan D, Hu X, Zhao S, Li L, Zhu L, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res*. 20(10):1128-37.
- Chen Y, Hu C, Hsu CK, Zhang Q, Bi C, Asnicar M, Hsiung HM, Fox N, Sliker LJ, Yang DD, Heiman ML, Shi Y. (2002). Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone

receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology*. 143(7):2469-77.

Chi SW, Hannon GJ, Darnell RB. (2012). An alternative mode of microRNA target recognition. *Nat Struct Mol Biol*. 19(3):321-7.

Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Blelloch R, Schroth GP, Nusbaum C, Bartel DP. (2010). Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*. 24(10):992-1009.

Choi JW, Kang SM, Lee Y, Hong SH, Sanek NA, Young WS, Lee HJ. (2013). MicroRNA profiling in the mouse hypothalamus reveals oxytocin-regulating microRNA. *J Neurochem*. 126(3):331-7.

Clarke IJ. (2015). Hypothalamus as an endocrine organ. *Compr Physiol*. 5(1):217-53.

Clegg DJ, Gotoh K, Kemp C, Wortman MD, Benoit SC, Brown LM, D'Alessio D, Tso P, Seeley RJ, Woods SC. (2011). Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol Behav*. 103(1):10-6.

Coolen M, Thieffry D, Drivenes Ø, Becker TS, Bally-Cuif L. (2012). miR-9 controls the timing of neurogenesis through the direct inhibition of antagonistic factors. *Dev Cell*. 22(5):1052-64.

Corp ES, Woods SC, Porte D Jr, Dorsa DM, Figlewicz DP, Baskin DG. (1986). Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett*. 70(1):17-22.

Couvreur O, Ferezou J, Gripois D, Serougne C, Crépin D, Aubourg A, Gertler A, Vacher CM, Taouis M. (2011). Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PLoS One*. 6(3):e18043.

Crépin D, Benomar Y, Riffault L, Amine H, Gertler A, Taouis M. (2014). The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment. *Mol Cell Endocrinol.* 384(1-2):1-11.

D

Dale N. (2011). Purinergic signaling in hypothalamic tanycytes: potential roles in chemosensing. *Semin Cell Dev Biol.* 22(2):237-44.

De Bond JA, Smith JT. (2014). Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reproduction.* 147(3):R53-63.

Deisseroth A, Velez R, Burk RD, Minna J, Anderson WF, Nienhuis A.

Delahaye F, Breton C, Risold PY, Enache M, Dutriez-Casteloot I, Laborie C, Lesage J, Vieau D. (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology.* 149(2):470-5.

Della-Zuana O, Presse F, Ortola C, Duhault J, Nahon JL, Levens N. (2002). Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26(10):1289-95.

Derghal A, Djelloul M, Airault C, Pierre C, Dallaporta M, Troadec JD, Tillement V, Tardivel C, Bariohay B, Trouslard J, Mounien L. (2015). Leptin is required for hypothalamic regulation of miRNAs targeting POMC 3'UTR. *Front Cell Neurosci.* 9:172.

Díaz C, Morales-Delgado N, Puelles L. (2015). Ontogenesis of peptidergic neurons within the genoarchitectonic map of the mouse hypothalamus. *Front Neuroanat.* 8:162.

Dube MG, Kalra SP, Kalra PS. (1999). Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res.* 842(2):473-7.

E

Ebling FJ, Wilson D, Wood J, Hughes D, Mercer JG, Morgan PJ, Barrett P. (2008). The thyrotropin-releasing hormone secretory system in the hypothalamus of the Siberian hamster in long and short photoperiods. *J Neuroendocrinol.* 20(5):576-86.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15(2):188-200.

Elizondo-Vega R, Cortes-Campos C, Barahona MJ, Oyarce KA, Carril CA, García-Robles MA. (2015). The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J Cell Mol Med.* 19(7):1471-82.

Elmqvist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB. (1998). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(2):741-6.

Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. (1996). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature.* 381(6581):415-21.

Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. (2009). Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes.* 58(4):820-8.

Ezzat A, Pereira A, Clarke IJ. (2015). Kisspeptin is a component of the pulse generator for GnRH secretion in female sheep but not the pulse generator. *Endocrinology.* 156(5):1828-37.

F

Férézou-Viala J, Roy AF, Sérougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, Gertler A, Delplanque B, Djiane J, Riottot M, Taouis M. (2007). Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 293(3):R1056-62.

Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG. (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*. 113(2):503-14.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669):806-11.

Franco JG, Fernandes TP, Rocha CP, Calviño C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Moura EG, Trevenzoli IH. (2012). Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *J Physiol*. 590(Pt 21):5503-18.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 19(1):92-105.

Fu Li-Ying and Van den Pol Anthony N. (2010). Kisspeptin directly excites anorexigenic pomc neurons, but inhibits orexigenic npy cells by indirect synaptic mechanism. *J Neurosci*. 30(30):10205–10219.

Furutani N, Hondo M, Kageyama H, Tsujino N, Mieda M, Yanagisawa M, Shioda S, Sakurai T. (2013). 2013. Neurotensin co-expressed in orexin-producing neurons in the lateral hypothalamus plays an important role in regulation of sleep/wakefulness states. *PLoS One*. 8(4):e62391.

G

Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP. (2011). Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of *lcy-6* and other microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 18(10):1139-46.

Geuzaine A, Tyhon A, Grisar T, Brabant C, Lakaye B, Tirelli E. (2014). Amphetamine reward in food restricted mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. *Behav Brain Res.* 262:14-20.

Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. (2010). Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biol Reprod.* 82(1):96-104.

Ghebremeskel K, Bitsanis D, Koukkou E, Lowy C, Poston L, Crawford MA. (1999). Maternal diet high in fat reduces docosahexaenoic acid in liver lipids of newborn and sucking rat pups. *Br J Nutr.* 81(5):395-404.

Gimpl G, Fahrenholz F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 81(2):629-83.

Giriko CÁ, Andreoli CA, Mennitti LV, Hosoume LF, Souto Tdos S, Silva AV, Mendes-da-Silva C. (2013). Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet. *Int J Dev Neurosci.* 31(8):731-9.

Glick M, Segal-Lieberman G, Cohen R, Kronfeld-Schor N. (2009). Chronic MCH infusion causes a decrease in energy expenditure and body temperature, and an increase in serum IGF-1 levels in mice. *Endocrine.* 36(3):479-85.

Gniuli D, Calcagno A, Caristo ME, Mancuso A, Macchi V, Mingrone G, Vettor R. (2008). Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. *J Lipid Res.* 49(9):1936-45.

Gopalakrishnan TV, Thompson EB, Anderson WF. (1977). Extinction of hemoglobin inducibility in Friend erythroleukemia cells by fusion with cytoplasm of enucleated mouse neuroblastoma or fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(4):1642-6.

Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. (2010). Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol.* 203(5):495.e1-8.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 123(4):631-40.

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engel P, Lim LP, Bartel DP. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 27(1):91-105.

Groessl F, Jeong JH, Talmage DA, Role LW, Jo YH. (2013). Overnight fasting regulates inhibitory tone to cholinergic neurons of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus. *PLoS One.* 8(4):e60828.

Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Brüning JC. (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci.* 8(10):1289-91.

Guo L, Chen F. (2014). A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene.* 544(1):1-7.

Gunapala KM, Gallardo CM, Hsu CT, Steele AD. (2011). Single gene deletions of orexin, leptin, neuropeptide Y, and ghrelin do not appreciably alter food anticipatory activity in mice. *PLoS One.* 6(3):e18377.

Gupta A, Srinivasan M, Thamadilok S, Patel MS. (2009). Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *J Endocrinol.* 200(3):293-300.

H

Håkansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B. (1998). Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci.* 18(1):559-72.

Hamrick MW, Dukes A, Arounleut P, Davis C, Periyasamy-Thandavan S, Mork S, Herberg S, Johnson MH, Isales CM, Hill WD, Otvos L Jr, Belin de Chantemèle EJ. (2015). The

adipokine leptin mediates muscle- and liver-derived IGF-1 in aged mice. *Exp Gerontol.* 70:92-6.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18(24):3016-27.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 125(5):887-901.

Hanson MA, Gluckman PD1. (2014). Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology?. *Physiol Rev.* 94(4):1027-76.

Hans-Rudolf Berthoud and Christopher Morrison. (2008). The Brain, Appetite, and Obesity. *Annu Rev Psychol.* 59:55-92.

Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. (2012). Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res.* 40(10):4626-40.

Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D. (2013). Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell.* 153(3):654-65.

Higuchi H, Niki T, Shiiya T. (2008). Feeding behavior and gene expression of appetite-related neuropeptides in micelacking for neuropeptide Y Y5 receptor subclass. *World J Gastroenterol.* 14(41):6312-7.

Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. (2008). Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294(5):E827-32.

Hill JW. (2012). PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab.* 16(Suppl 3):S627-36.

Hollins SL, Goldie BJ, Carroll AP, Mason EA, Walker FR, Eyles DW, Cairns MJ. (2014). Ontogeny of small RNA in the regulation of mammalian brain development. *BMC Genomics.* 15:777.

Hubé F, Francastel C. (2015). Mammalian introns: when the junk generates molecular diversity. *Int J Mol Sci.* 16(3):4429-52.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W,

Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 88(1):131-41.

Hutvagner G, Zamore PD. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 297(5589):2056-60.

I

Inoue H, Ogawa W, Asakawa A, Okamoto Y, Nishizawa A, Matsumoto M, Teshigawara K, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Notohara K, Katayose K, Okamura H, Kahn CR, Noda T, Takeda K, Akira S, Inui A, Kasuga M. (2006). Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab*. 3(4):267-75.

Inoue H. (2015). Central insulin-mediated regulation of hepatic glucose production. *Endocr J*.

Ikeda H, West DB, Pustek JJ, Figlewicz DP, Greenwood MR, Porte D Jr, Woods SC. (1986). Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite*. 7(4):381-6.

Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. (1995). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol*. 9(4):478-86.

Itadani H, Nakamura T, Itoh J, Iwaasa H, Kanatani A, Borkowski J, Ihara M, Ohta M. (1998). Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 8;250(1):68-71.

Izant JG, Weintraub H. (1984). Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell*. 36(4):1007-15.

J

Jang H, Serra C. (2014). Nutrition, epigenetics, and diseases. *Clin Nutr Res.* 3(1):1-8.

Jeong JK, Kim JG, Lee BJ. (2014). Participation of the central melanocortin system in metabolic regulation and energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 71(19):3799-809.

Jobst EE, Enriori PJ, Cowley MA. (2004). The electrophysiology of feeding circuits. *Trends Endocrinol Metab.* 15(10):488-99.

Jones HN, Woollett LA, Barbour N, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. (2009). High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB J.* (1):271-8.

Jung HJ, Suh Y. (2012). MicroRNA in Aging: From Discovery to Biology. *Curr Genomics.* 13(7):548-57.

K

Kang SS, Kurti A, Fair DA, Fryer JD. (2014). Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. *J Neuroinflammation.* 11:156.

Kappil M, Chen J. (2014). Environmental exposures in utero and microRNA. *Curr Opin Pediatr.* 26(2):243-51.

Kasbi Chadli F, Andre A, Prieur X, Loirand G, Meynier A, Krempf M, Nguyen P, Ouguerram K. (2012). n-3 PUFA prevent metabolic disturbances associated with obesity and improve endothelial function in golden Syrian hamsters fed with a high-fat diet. *Br J Nutr.* 107(9):1305-15.

Kasbi-Chadli F, Boquien CY, Simard G, Ulmann L, Mimouni V, Leray V, Meynier A, Ferchaud-Roucher V, Champ M, Nguyen P, Ouguerram K. (2014). Maternal supplementation with n-3 long chain polyunsaturated fatty acids during perinatal period alleviates the metabolic syndrome disturbances in adult hamster pups fed a high-fat diet after weaning. *J Nutr Biochem.* 25(7):726-33.

Kasbi-Chadli F, Ferchaud-Roucher V, Krempf M, Ouguerram K. (2015). Direct and maternal n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation improved triglyceridemia and glycemia through the regulation of hepatic and muscle sphingolipid synthesis in offspring hamsters fed a high-fat diet. *Eur J Nutr.* Epub ahead of print.

Kaur S, Thankachan S, Begum S, Blanco-Centurion C, Sakurai T, Yanagisawa M, Shiromani PJ. (2008). Entrainment of temperature and activity rhythms to restricted feeding in orexin knock out mice. *Brain Res.* 1205:47-54.

Khan IY, Taylor PD, Dekou V, Seed PT, Lakasing L, Graham D, Dominiczak AF, Hanson MA, Poston L. (2003). Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension.* 41(1):168-75.

Khan IY, Dekou V, Hanson M, Poston L, Taylor P. (2004). Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation.* 110(9):1097-102.

Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, Taylor PD. (2005). A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288(1):R127-33.

Kim KW, Sohn JW, Kohno D, Xu Y, Williams K, Elmquist JK. (2011). SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: a key regulator of homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 336(1-2):219-23.

Kim YJ, Bi S. (2015). Knockdown of neuropeptide Y in the dorsomedial hypothalamus reverses high fat diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* ajpregu.00174.2015.

King BM. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* 87(2):221-44.

- Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, Taylor PD, Coen CW. (2009). Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*. 4(6):e5870.
- Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE, Mountjoy KG, Saper CB, Elmquist JK. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. 457(3):213-35.
- Kloosterman WP, Wienholds E, Ketting RF, Plasterk RH. (2004). Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res*. 32(21):6284-91.
- Kokkotou E, Jeon JY, Wang X, Marino FE, Carlson M, Trombly DJ, Maratos-Flier E. (2005). Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 289(1):R117-24.
- Könner AC, Klöckener T, Brüning JC. (2009). Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav*. 97(5):632-8.
- Könner AC, Brüning JC. (2012). Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab*. 16(2):144-52.
- Kozak R, Bulet A, Bulet C, Beck B. (2000). Dietary composition during fetal and neonatal life affects neuropeptide Y functioning in adult offspring. *Brain Res Dev Brain Res*. 125(1-2):75-82.
- Kozak R, Bulet A, Bulet C, Beck B. (2000). Dietary composition during fetal and neonatal life affects neuropeptide Y functioning in adult offspring. *Brain Res Dev Brain Res*. 125(1-2):75-82.
- Krasnow SM, Nguyen ML, Marks DL. (2011). Increased maternal fat consumption during pregnancy alters body composition in neonatal mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 301(6):E1243-53.
- Krieger MS, Conrad LC, Pfaff DW. (1979). An autoradiographic study of the efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol*. 183(4):785-815.
- Kropp J, Khatib H. (2015). Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *J Dairy Sci*. 98(9):6552-63.

Krude H1, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* 19(2):155-7.

Kurrasch DM, Cheung CC, Lee FY, Tran PV, Hata K, Ingraham HA. (2007). The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. *J Neurosci.* 27(50):13624-34.

L

Ladewig E, Okamura K, Flynt AS, Westholm JO, Lai EC. (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res.* 22(9):1634-45.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 294(5543):853-8.

Langhans W, Delprete E, Scharrer E. (1991). Mechanisms of vasopressin's anorectic effect. *Physiol Behav.* 49(1):169-76.

Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. (2013). Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* 17(4):607-17.

Langlet F. (2014). Tanycytes: a gateway to the metabolic hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 26(11):753-60.

Lau J, Herzog H. (2014). CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Front Neurosci.* 8:313.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 294(5543):858-62.

Le TD, Zhang J, Liu L, Li J. (2015). Ensemble Methods for MiRNA Target Prediction from Expression Data. *PLoS One.* 10(6):e0131627.

Lee CT, Risom T, Strauss WM. (2007). Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol.* 26(4):209-18.

Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, Takiar V, Charubhumi V, Balordi F, Takebayashi H, Aja S, Ford E, Fishell G, Blackshaw S. (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci.* 15(5):700-2.

Lee RC, Ambros V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 294(5543):862-4.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75(5):843-54.

Lee S, Bookout AL, Lee CE, Gautron L, Harper MJ, Elias CF, Lowell BB, Elmquist JK. (2012). Laser-capture microdissection and transcriptional profiling of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 520(16):3617-32.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 425(6956):415-9.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21(17):4663-70.

Leininger GM, Jo YH, Leshan RL, Louis GW, Yang H, Barrera JG, Wilson H, Opland DM, Faouzi MA, Gong Y, Jones JC, Rhodes CJ, Chua S Jr, Diano S, Horvath TL, Seeley RJ, Becker JB, Münzberg H, Myers MG Jr. (2009). Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab.* 10(2):89-98.

Leininger GM, Opland DM, Jo YH, Faouzi M, Christensen L, Cappellucci LA, Rhodes CJ, Gnegy ME, Becker JB, Pothos EN, Seasholtz AF, Thompson RC, Myers MG Jr. (2011). Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. *Cell Metab.* 14(3):313-23.

Lempradl A, Pospisilik JA, Penninger JM. (2015). Exploring the emerging complexity in transcriptional regulation of energy homeostasis. *Nat Rev Genet.* 16(11):665-81.

- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120(1):15-20.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 115(7):787-98.
- Li G, Kohorst JJ, Zhang W, Laritsky E, Kunde-Ramamoorthy G, Baker MS, Fiorotto ML, Waterland RA. (2013). Early postnatal nutrition determines adult physical activity and energy expenditure in female mice. *Diabetes*. 62(8):2773-83.
- Li Z, Ceccarini G, Eisenstein M, Tan K, Friedman JM. (2013). Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor. *Mol Metab*. 2(4):364-75.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 433(7027):769-73.
- Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. (2000). Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 24(5):639-46.
- Lu B, Diz-Chaves Y, Markovic D, Contarino A, Penicaud L, Fanelli F, Clark S, Lehnert H, Cota D, Grammatopoulos DK, Tabarin A. (2015). The corticotrophin-releasing factor/urocortin system regulates white fat browning in mice through paracrine mechanisms. *Int J Obes (Lond)*. 39(3):408-17.
- Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M. (2007). Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology*. 148(10):4601-11.
- Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science*. 28;310(5748):683-5.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(23):9667-72.

M

- Macneil DJ. (2013). The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4:49.
- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*. 311(5758):195-8.
- Maggi R, Zasso J, Conti L. (2015). Neurodevelopmental origin and adult neurogenesis of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Cell Neurosci*. 8:440.
- Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, McGarry JD, Parker KL. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*. 143(2):607-14.
- Majdic G. (2009). Integrative role of brain and hypothalamus in the control of energy balance. *Acta Chim Slov*. 56(2):289-296.
- Makarova EN, Chepeleva EV, Panchenko PE, Bazhan NM. (2013). Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 305(11):R1268-80.
- Maloyan A, Muralimanoharan S, Huffman S, Cox LA, Nathanielsz PW, Myatt L, Nijland MJ. (2013). Identification and comparative analyses of myocardial miRNAs involved in the fetal response to maternal obesity. *Physiol Genomics*. 45(19):889-900.
- Maningat PD, Sen P, Rijnkels M, Sunehag AL, Hadsell DL, Bray M, Haymond MW. (2009). Gene expression in the human mammary epithelium during lactation: the milk fat globule transcriptome. *Physiol Genomics*. 37(1):12-22.
- Marín RM, Vaníček J. (2012). Optimal use of conservation and accessibility filters in microRNA target prediction. *PLoS One*. 7(2):e32208.
- Markakis. E.A. (2002). Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 257–291.
- Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE, Palmiter RD. (1998). Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med*. 4(6):718-21.

Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S. (2002). Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(5):3240-5.

Martin Agnoux A, Antignac JP, Boquien CY, David A, Desnots E, Ferchaud-Roucher V, Darmaun D, Parnet P, Alexandre-Gouabau MC. (2015). Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. *J Nutr Biochem.* 26(7):784-95.

Martin HC, Wani S, Steptoe AL, Krishnan K, Nones K, Nourbakhsh E, Vlassov A, Grimmond SM, Cloonan N. (2014). Imperfect centered miRNA binding sites are common and can mediate repression of target mRNAs. *Genome Biol.* 15(3):R51.

Masuyama H, Hiramatsu Y. (2014). Additive effects of maternal high fat diet during lactation on mouse offspring. *PLoS One.* 9(3):e92805.

Mayerl S, Liebsch C, Visser TJ, Heuer H. (2015). Absence of TRH receptor 1 in male mice affects gastric ghrelin production. *Endocrinology.* 156(2):755-67.

Mittelman-Smith MA, Williams H, Krajewski-Hall SJ, Lai J, Ciofi P, McMullen NT, Rance NE. (2012). Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. *Endocrinology.* 153(6):2800-12.

Mo C, Cai G, Huang L, Deng Q, Lin D, Cui L, Wang Y, Li J. (2015). Corticotropin-releasing hormone (CRH) stimulates cocaine- and amphetamine-regulated transcript gene (CART1) expression through CRH type 1 receptor (CRHR1) in chicken anterior pituitary. *Mol Cell Endocrinol.* S0303-7207(15)30073-3.

Morita S, Miyata S. (2012). Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 349(2):589-603.

Morris MJ, Chen H. (2009). Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. *Int J Obes (Lond).* 33(1):115-22.

Muglia LJ, Jacobson L, Luedke C, Vogt SK, Schaefer ML, Dikkes P, Fukuda S, Sakai Y, Suda T, Majzoub JA. (2000). Corticotropin-releasing hormone links pituitary adrenocorticotropin gene expression and release during adrenal insufficiency. *J Clin Invest.* 105(9):1269-77.

Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 518(7):943-62.

Murase D, Namekawa S, Ohkubo T. (2015). Leptin activates chicken growth hormone promoter without chicken STAT3 in vitro. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 191:46-52.

Musumeci G, Castorina S, Castrogiovanni P, Loreto C, Leonardi R, Aiello FC, Magro G, Imbesi R. (2015). A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. *Acta Histochem.* 117(4-5):355-66.

N

Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. (2000). Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res.* 873(1):181-7.

Nakamura K, Aoyagi T, Hiroyama M, Kusakawa S, Mizutani R, Sanbe A, Yamauchi J, Kamohara M, Momose K, Tanoue A. (2009). Both V(1A) and V(1B) vasopressin receptors deficiency result in impaired glucose tolerance. *Eur J Pharmacol.* 613(1-3):182-8.

Navarro VM. (2013). Interactions between kisspeptins and neurokinin B. *Adv Exp Med Biol.* 784:325-47.

Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. (2012). IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet.* 28(11):544-9.

Nguyen AD, Mitchell NF, Lin S, Macia L, Yulyaningsih E, Baldock PA, Enriquez RF, Zhang L, Shi YC, Zolotukhin S, Herzog H, Sainsbury A. (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PLoS One*. 7(6):e40191.

Nguyen LH, Zhu H. (2015). Lin28 and let-7 in cell metabolism and cancer. *Transl Pediatr*. 4(1):4-11.

Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA*. 13(11):1894-910.

Nuñez A, Rodrigo-Angulo ML, Andrés ID, Garzón M. (2009). Hypocretin/Orexin neuropeptides: participation in the control of sleep-wakefulness cycle and energy homeostasis. *Curr Neuropharmacol*. 7(1):50-9.

Nuzzaci D, Laderrière A, Lemoine A, Nédélec E, Pénicaud L, Rigault C, Benani A. (2015). Plasticity of the Melanocortin System: Determinants and Possible Consequences on Food Intake. *Front Endocrinol*. 6:143.

O

Obici S, Feng Z, Karkanas G, Baskin DG, Rossetti L. (2002). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci*. 5(6):566-72.

Osterstock G, Escobar P, Mitutsova V, Gouty-Colomer LA, Fontanaud P, Molino F, Fehrentz JA, Carmignac D, Martinez J, Guerineau NC, Robinson IC, Mollard P, Méry PF. (2010). Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. *PLoS One*. 5(2):e9159.

Ottaway N, Mahbod P, Rivero B, Norman LA, Gertler A, D'Alessio DA, Perez-Tilve D. (2015). Diet-induced obese mice retain endogenous leptin action. *Cell Metab*. 21(6):877-82.

P

Parente LB, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. (2008). Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. *Clin Nutr.* 27(4):623-34.

Parker J.A., Stephen R. Bloom. (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. review. *Neuropharmacology* 63 18-30.

Parker JS, Roe SM, Barford D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature.* 434(7033):663-6.

Pasquali R, Patton L, Gambineri A. (2007). Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 14(6):482-7.

Pedrazzini T, Seydoux J, Künstner P, Aubert JF, Grouzmann E, Beermann F, Brunner HR. (1998). Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nat Med.* 4(6):722-6.

Pérez CA, Stanley SA, Wysocki RW, Havranova J, Ahrens-Nicklas R, Onyimba F, Friedman JM. (2011). Molecular annotation of integrative feeding neural circuits. *Cell Metab.* 13(2):222-32.

Peterson KJ, Dietrich MR, McPeck MA. (2009). MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *Bioessays.* 31(7):736-47.

Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM. (2010). Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One.* 5(10):e13515.

Pio G, Malerba D, D'Elia D, Ceci M. (2014). Integrating microRNA target predictions for the discovery of gene regulatory networks: a semi-supervised ensemble learning approach. *BMC Bioinformatics.* 15 Suppl 1:S4.

Pirnik Z, Petrak J, Bundzikova J, Mravec B, Kvetnansky R, Kiss A. (2009). Response of hypothalamic oxytocinergic neurons to immobilization stress is not dependent on the presence of corticotrophin releasing hormone (CRH): a CRH knock-out mouse study. *J Physiol Pharmacol.* 60(2):77-82.

Plum L, Schubert M, Brüning JC. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab.* 16(2):59-65.

Podolska A, Kaczkowski B, Kamp Busk P, Søkilde R, Litman T, Fredholm M, Cirera S. (2011). MicroRNA expression profiling of the porcine developing brain. *PLoS One.* 6(1):e14494.

Pollock KE, Stevens D, Pennington KA, Thaisrivongs R, Kaiser J, Ellersieck MR, Miller DK, Schulz LC. (2015). Hyperleptinemia During Pregnancy Decreases Adult Weight of Offspring and Is Associated With Increased Offspring Locomotor Activity in Mice. *Endocrinology.* 156(10):3777-90.

Poon K, Barson JR, Fagan SE, Leibowitz SF. (2012). Developmental changes in embryonic hypothalamic neurons during prenatal fat exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303(3):E432-41.

Poon K, Mandava S, Chen K, Barson JR, Buschlen S, Leibowitz SF. (2013). Prenatal exposure to dietary fat induces changes in the transcriptional factors, TEF and YAP, which may stimulate differentiation of peptide neurons in rat hypothalamus. *PLoS One.* 8(10):e77668.

Prevot V, Langlet F, Dehouck B. (2013). Flipping the tanycyte switch: how circulating signals gain direct access to the metabolic brain. *Aging (Albany NY).* 5(5):332-4.

Psotta L, Lessmann V, Endres T. (2013). Impaired fear extinction learning in adult heterozygous BDNF knock-out mice. *Neurobiol Learn Mem.* 103:34-8.

Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH, Tamashiro KL. (2011). Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav.* 104(3):474-9.

Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH, Tamashiro KL. (2011). Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav.* 104(3):474-9.

Q

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature.* 380(6571):243-7.

R

Reynolds CM, Vickers MH, Harrison CJ, Segovia SA, Gray C. (2014). High fat and/or high salt intake during pregnancy alters maternal meta-inflammation and offspring growth and metabolic profiles. *Physiol Rep.* 2(8).

Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol.* 15(10):1748-57.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14(10A):1902-10.

Rodríguez EM, Blázquez JL, Pastor FE, Peláez B, Peña P, Peruzzo B, Amat P. (2005). Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol.* 247:89-164.

Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides.* 31(4):757-76.

Rolls BA, Gurr MI, van Duijvenvoorde PM, Rolls BJ, Rowe EA. (1986). Lactation in lean and obese rats: effect of cafeteria feeding and of dietary obesity on milk composition. *Physiol Behav.* 38(2):185-90.

Rousseau K, Kauser S, Pritchard LE, Warhurst A, Oliver RL, Slominski A, Wei ET, Thody AJ, Tobin DJ, White A. (2007). Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis. *FASEB J.* 21(8):1844-56.

S

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 92(4):573-85.

Sánchez J, Priego T, García AP, Llopis M, Palou M, Picó C, Palou A. (2012). Maternal supplementation with an excess of different fat sources during pregnancy and lactation differentially affects feeding behavior in offspring: putative role of the leptin system. *Mol Nutr Food Res.* 56(11):1715-28.

Sanders TR, Kim DW, Glendining KA, Jasoni CL. (2014). Maternal obesity and IL-6 lead to aberrant developmental gene expression and deregulated neurite growth in the fetal arcuate nucleus. *Endocrinology.* 155(7):2566-77.

Sangiao-Alvarellos S, Pena-Bello L, Manfredi-Lozano M, Tena-Sempere M, Cordido F. (2014). Perturbation of hypothalamic microRNA expression patterns in male rats after metabolic distress: impact of obesity and conditions of negative energy balance. *Endocrinology.* 155(5):1838-50.

Sartorius T, Peter A, Heni M, Maetzler W, Fritsche A, Häring HU, Hennige AM. (2015). The brain response to peripheral insulin declines with age: a contribution of the blood-brain barrier ?. *PLoS One.* 10(5):e0126804.

Saugstad JA. (2010). MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30(9):1564-76.

Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdié P, Bourrier E, Dehouck B, Banères JL, Martinez J, Méry PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prévot V, Mollard P. (2013). Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(4):1512-7.

Schipper L, Bouyer K, Oosting A, Simerly RB, van der Beek EM. (2013). Postnatal dietary fatty acid composition permanently affects the structure of hypothalamic pathways controlling energy balance in mice. *Am J Clin Nutr.* 98(6):1395-401.

Schneeberger M, Altirriba J, García A, Esteban Y, Castaño C, García-Lavandeira M, Alvarez CV, Gomis R, Claret M. (2012). Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Mol Metab.* 2(2):74-85.

Schneeberger M, Altirriba J, García A, Esteban Y, Castaño C, García-Lavandeira M, Alvarez CV, Gomis R, Claret M. (2012). Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Mol Metab.* 2(2):74-85.

Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al. (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology.* 130(6):3608-16.

Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med.* 2(5):589-93.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature.* 404(6778):661-71.

Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, Elmquist JK. (2009). Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol.* 514(5):518-32.

Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 5(3):R13.

Seitz H, Zamore PD. (2006). Rethinking the microprocessor. *Cell.* 125(5):827-9.

Shibusawa N, Yamada M, Hirato J, Monden T, Satoh T, Mori M. (2000). Requirement of thyrotropin-releasing hormone for the postnatal functions of pituitary thyrotrophs: ontogeny study of congenital tertiary hypothyroidism in mice. *Mol Endocrinol.* 14(1):137-46.

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature.* 396(6712):670-4.

Shin C, Nam JW, Farh KK, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell.* 38(6):789-802.

Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I. (2011). NAViGaTing the microne--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS One.* 6(2):e17429.

Skoog KM, Cain ST, Nemeroff CB. (1986). Centrally administered neurotensin suppresses locomotor hyperactivity induced by d-amphetamine but not by scopolamine or caffeine. *Neuropharmacology.* 25(7):777-82.

Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. (2014). The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update.* 20(4):485-500.

Slominski A, Heasley D, Mazurkiewicz JE, Ermak G, Baker J, Carlson JA. (1999). Expression of proopiomelanocortin (POMC)-derived melanocyte-stimulating hormone (MSH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) peptides in skin of basal cell carcinoma patients. *Hum Pathol.* 30(2):208-15.

- Smart JL, Tolle V, Low MJ. (2006). Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *J Clin Invest.* 116(2):495-505.
- Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci.* 21(6):1469-77.
- Sobrinho Crespo C, Perianes Cachero A, Puebla Jiménez L, Barrios V, Arilla Ferreiro E. (2014). Peptides and food intake. *Front Endocrinol.* 5:58.
- Sohn JW, Williams KW. (2012). Functional heterogeneity of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons: implications for diverging melanocortin pathways. *Mol Neurobiol.* 45(2):225-33.
- Soundara Pandi SP, Chen M, Guduric-Fuchs J, Xu H, Simpson DA. (2013). Extremely complex populations of small RNAs in the mouse retina and RPE/choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54(13):8140-51.
- Spector R, Robert Snodgrass S, Johanson CE. (2015). A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Exp Neurol.* 273:57-68.
- Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD, Patel MS. (2006). Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291(4):E792-9.
- Stachowiak EK, Srinivasan M, Stachowiak MK, Patel MS. (2013). Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. *Metab Brain Dis.* 28(4):721-5.
- Stellar E. (1994). The physiology of motivation. 1954. *Psychol Rev.* 101(2):301-11.
- Subhedar NK, Nakhate KT, Upadhya MA, Kokare DM. (2014). CART in the brain of vertebrates: circuits, functions and evolution. *Peptides.* 54:108-30.

Sullivan EL, Riper KM, Lockard R, Valleau JC. (2015). Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior. *Horm Behav.* S0018-506X(15)00058-6.

Sullivan EL, Smith MS, Grove KL. (2011). Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology.* 93(1):1-8.

Sun B, Song L, Tamashiro KL, Moran TH, Yan J. (2014). Large litter rearing improves leptin sensitivity and hypothalamic appetite markers in offspring of rat dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Endocrinology.* 155(9):3421-33.

Suter MA, Ma J, Vuguin PM, Hartil K, Fiallo A, Harris RA, Charron MJ, Aagaard KM. (2014). In utero exposure to a maternal high-fat diet alters the epigenetic histone code in a murine model. *Am J Obstet Gynecol.* 210(5):463.e1-463.e11.

Suzuki Y, Nakahara K, Maruyama K, Okame R, Ensho T, Inoue Y, Murakami N. (2014). Changes in mRNA expression of arcuate nucleus appetite-regulating peptides during lactation in rats. *J Mol Endocrinol.* 52(2):97-109.

T

Tan GC, Chan E, Molnar A, Sarkar R, Alexieva D, Isa IM, Robinson S, Zhang S, Ellis P, Langford CF, Guillot PV, Chandrashekrana A, Fisk NM, Castellano L, Meister G, Winston RM, Cui W, Baulcombe D, Dibb NJ. (2014). 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. *Nucleic Acids Res.* 42(14):9424-35.

Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW. (1996). Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol.* 376(1):143-73.

Tolson KP, Garcia C, Yen S, Simonds S, Stefanidis A, Lawrence A, Smith JT, Kauffman AS. (2014). Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity. *J Clin Invest.* 124(7):3075-9.

Tortoriello DV, McMinn J, Chua SC. (2004). Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology*. 145(3):1238-47.

Tran PV, Lee MB, Marín O, Xu B, Jones KR, Reichardt LF, Rubenstein JR, Ingraham HA. (2003). Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Mol Cell Neurosci*. 22(4):441-53.

True C, Kirigiti M, Ciofi P, Grove KL, Smith MS. (2010). Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol*. 23(1):52-64.

U

Uhles S, Moede T, Leibiger B, Berggren PO, Leibiger IB. (2003). Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *J Cell Biol*. 163(6):1327-37.

Unger J, McNeill TH, Moxley RT 3rd, White M, Moss A, Livingston JN. (1989). Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience*. 31(1):143-57.

V

Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. (2000). Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest*. 106(2):253-62.

Van de Wall E, Leshan R, Xu AW, Balthasar N, Coppari R, Liu SM, Jo YH, MacKenzie RG, Allison DB, Dun NJ, Elmquist J, Lowell BB, Barsh GS, de Luca C, Myers MG Jr, Schwartz GJ, Chua SC Jr. (2008). Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology*. 149(4):1773-85.

Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol.* 2000 Dec 11;428(2):191-212.

Van Swieten MM, Pandit R, Adan RA, van der Plasse G. (2014). The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J Chem Neuroanat.* 61-62:207-20.

Vaughn AW, Baumeister AA, Hawkins MF, Anticich TG. (1990). Intranigral microinjection of neurotensin suppresses feeding in food deprived rats. *Neuropharmacology.* 29(10):957-60.

Vickers Mark H., Krechowec Stefan O., Gluckman Peter D. and Breier Bernhard H. (2009). *The Role of Leptin during Early Life in Imprinting Later Metabolic Responses.* Landes Bioscience.

Vinnikov IA, Hajdukiewicz K, Reymann J, Beneke J, Czajkowski R, Roth LC, Novak M, Roller A, Dörner N, Starkuviene V, Theis FJ, Erfle H, Schütz G, Grinevich V, Konopka W. (2014). Hypothalamic miR-103 protects from hyperphagic obesity in mice. *J Neurosci.* 34(32):10659-74.

Vogt MC, Paeger L, Hess S, Steculorum SM, Awazawa M, Hampel B, Neupert S, Nicholls HT, Mauer J, Hausen AC, Predel R, Kloppenburg P, Horvath TL, Brüning JC. (2014). Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell.* 156(3):495-509.

Volpato AM, Schultz A, Magalhães-da-Costa E, Correia ML, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. (2012). Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. *Neuroendocrinology.* 96(4):272-84.

W

Wang D, He X, Zhao Z, Feng Q, Lin R, Sun Y, Ding T, Xu F, Luo M, Zhan C. (2015). 2015. Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Front Neuroanat.* 9:40.

- Wang Z, Xu W, Liu Y. (2015). Integrating full spectrum of sequence features into predicting functional microRNA-mRNA interactions. *Bioinformatics*. pii: btv392.
- Ware S, Voigt JP, Langley-Evans SC. (2015). Body composition and behaviour in adult rats are influenced by maternal diet, maternal age and high-fat feeding. *J Nutr Sci*. 4:e3.
- Westholm JO, Lai EC. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*. 93(11):1897-904.
- Wickramasinghe S, Hua S, Rincon G, Islas-Trejo A, German JB, Lebrilla CB, Medrano JF. (2011). Transcriptome profiling of bovine milk oligosaccharide metabolism genes using RNA-sequencing. *PLoS One*. 6(4):e18895.
- Wickramasinghe S, Rincon G, Islas-Trejo A, Medrano JF. (2012). Transcriptional profiling of bovine milk using RNA sequencing. *BMC Genomics*. 13:45.
- Widdowson PS, Upton R, Buckingham R, Arch J, Williams G. (1997). Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity. *Diabetes*. 46(11):1782-5.
- Wierup N, Richards WG, Bannon AW, Kuhar MJ, Ahrén B, Sundler F. (2005). CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight. *Regul Pept*. 129(1-3):203-11.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75(5):855-62.
- Williams AE. (2008). Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci*. 65(4):545-62.
- Williams G, Cai XJ, Elliott JC, Harrold JA. (2004). Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav*. 81(2):211-22.
- Williams L, Seki Y1, Vuguin PM, Charron MJ. (2014). Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. *Biochim Biophys Acta*. 1842(3):507-19.

Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci.* 24:429-58.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 75(5):855-62.

Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz MW. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science.* 280(5368):1378-83.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. (2005). Appetite control. *J Endocrinol.* 184(2):291-318.

X

Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci.* 6(7):736-42.

Y

Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu ZW, Gao XB, Confavreux C, Klemenhagen KC, Tanaka KF, Gingrich JA, Guo XE, Tecott LH, Mann JJ, Hen R, Horvath TL, Karsenty G. (2009). A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell.* 138(5):976-89.

Yamada M, Saga Y, Shibusawa N, Hirato J, Murakami M, Iwasaki T, Hashimoto K, Satoh T, Wakabayashi K, Taketo MM, Mori M. (1997). Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(20):10862-7.

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med.* 5(9):1066-70.

Yexica Aponte, Deniz Atasoy & Scott M Sternson. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience*. 1038/nn.2739.

Yin W, Gore AC. (2010). The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging. *Ann N Y Acad Sci*. 1204:113-22.

Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S. (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab*. 1(6):371-8.

Z

Zabavnik J, Arbuthnott G, Eidne KA. (1993). Distribution of thyrotrophin-releasing hormone receptor messenger RNA in rat pituitary and brain. *Neuroscience*. 53(3):877-87.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101(1):25-33.

Zeng Y, Cullen BR. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*. 32(16):4776-85.

Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 118(1):57-68.

Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, Hanson M, Lehnert H, Ceriello A, Byrne CD. (2009). Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genomics*.10:478.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372(6505):425-32.

Zhang Y, Verbeek FJ. (2010). Comparison and integration of target prediction algorithms for microRNA studies. *J Integr Bioinform*. 7(3).

Zhang ZY, Dodd GT, Tiganis T. (2015). Protein Tyrosine Phosphatases in Hypothalamic Insulin and Leptin Signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 36(10):661-74.

Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Yu M, Xu J, Wang Z. (2015). Maternal protein restriction induces early-onset glucose intolerance and alters hepatic genes expression in the peroxisome proliferator-activated receptor pathway in offspring. *J Diabetes Investig.* 6(3):269-79.

Zhu H, Shyh-Chang N, Segrè AV, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, Takeuchi A, Engreitz JM, Hagan JP, Kharas MG, Urbach A, Thornton JE, Triboulet R, Gregory RI; DIAGRAM Consortium; MAGIC Investigators, Altshuler D, Daley GQ. (2011). The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell.* 147(1):81-94.

Zlokovic BV, Jovanovic S, Miao W, Samara S, Verma S, Farrell CL. (2000). Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology.* 141(4):1434-41.

CINETIQUE D'EXPRESSION HYPOTHALAMIQUE DES MICROARN CHEZ LE RAT : IMPACT D'UN REGIME MATERNEL HYPERLIPIDIQUE

Mots clés : *programmation métabolique, régime maternel hyperlipidique, hypothalamus, noyau arqué, microARN, insulino-résistance, rat.*

Résumé : Le concept de programmation métabolique postule que l'environnement périnatal conditionne la physiologie de la descendance à long terme. Un environnement périnatal hyperlipidique (HF) peut mal-programmer les homéostasies énergétique, glucidique et lipidique des descendances adultes. Le noyau arqué hypothalamique (ARC) est un régulateur important de ces homéostasies. Par ailleurs, l'expression du génome est modulée par des ARN d'une vingtaine de bases, les microARN (miARN). J'ai participé à l'étude physiologique et moléculaire, des stades P4 à P216, des descendances de mères nourries avec un régime contrôle (C) ou un régime HF modéré en protéines.

J'ai utilisé la technologie de séquençage haut-débit Illumina et RT-qPCR pour suivre l'expression de plus de 500 miARN. J'ai montré que 1/ l'expression d'un tiers des miARN varie entre P4 à P28 chez les descendances C et HF, 2/ les cinétiques correspondantes sont très similaires entre descendances C et HF bien que les descendances HF montrent un retard de croissance et une hypoleptinémie durant la période post-natale précoce, 3/ l'expression d'un quart des miARN diffère entre les descendances C et HF adultes sous régime C, tout comme leur insuliniémie, 4/ pour un tiers de ces miARN, le transfert des descendances HF sous régime HF à l'âge adulte (environnements périnataux et adultes concordants) rétablit une expression proche des descendances C.

MICRORNA HYPOTHALAMIC KINETIC EXPRESSION IN RAT : IMPACT OF MATERNAL HIGH FAT DIET

Key Words : *metabolic programming, maternal high fat diet, hypothalamus, arcuate nucleus, microRNA, insulin resistance, rat.*

Abstract : The metabolic programming concept postulate that the perinatal environment conditionne the long terme offspring's physiology. A high fat perinatal environment especially malprogrammed the energy, glucidic and lipidic homeostasis in the adult offspring. The hypothalamic arcuate nucleus is an important regulator of energy homeostasis. Moreover, the genome expression is modulated by small RNAs of about twenty nucleotides, the microRNAs (miRNAs), that regulate post-transcriptionnally target mRNA degradation or translation. I used the high throughput sequencing technology Illumina to study the expression of more about 500 miRNAs to stages P4 at P216 in the control (C) or high fat and moderate protein (HF) offspring.

I have showed that 1/ massive differential miRNA expression varied in the C offspring, between P4 and P28. 2/ miRNA kinetic expression is similar in HF offspring. I have also observed that the maternal HF diet induced 3/ a early post-natal growth retardation as well as a temporary hypoleptinemia, 4/ a hyperinsulinemia and hyperglycemia in the adult HF offspring under HF diet, 5/ little impact on the miRNA expression profil that are robust to these early developmental stages, 6/ the expression profil miRNA modification in the adulthood and 7/ a differential miRNA expression reversible when the perinatal environment agree with adulthood environment.