Mémoire épigénétique des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles au cours du développement et à long terme

Polina Panchenko

▶ **To cite this version:**

Polina Panchenko. Mémoire épigénétique des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles au cours du développement et à long terme. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066574 . tel-01332747

HAL Id: tel-01332747

https://theses.hal.science/tel-01332747

Submitted on 16 Jun 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.

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

UFR de Biologie et Sciences de la Nature

Ecole doctorale : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Mention : Physiologie et Physiopathologie

THESE

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Paris VI

Présentée et soutenue par

Polina PANCHENKO

le 15 Décembre 2015

Sujet de la thèse

Mémoire épigénétique des trajectoires pondérales maternelles préconceptionnelles au cours du développement et à long terme

Directrice de Thèse: Pr. Claudine Junien
Co-directrice de Thèse: Dr. Anne Gabory

UMR1198 INRA Biologie du Développement et Reproduction

Jury

Pr. Nathalie Dostatni	Présidente
Dr. Daniel Vaiman	Rapporteur
Dr. Pierre Fafournoux	Rapporteur
Dr. Laurent Kappeler	Examinateur
Dr. Patricia Parnet	Examinateur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Nathalie Dostatni pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je remercie chaleureusement le Dr. Daniel Vaiman et le Dr. Pierre Fafournoux, pour avoir pris le temps d'évaluer mon travail en détail. La version finale de ce mémoire a bénéficié de leurs remarques précieuses. Je remercie le Dr. Laurent Kappeler et le Dr. Patricia Parnet d'avoir accepté d'être examinateurs. Merci au jury de consacrer son temps et d'avoir accepté d'assister à la présentation de cette thèse.

Je tiens à remercier Corinne Cotinot de l'accueil au sein de son laboratoire "Biologie du Développement et Reproduction" (BDR) à INRA où j'ai passé plus de quatre ans.

J'adresse mes sincères remerciements à Claudine Junien. Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe en septembre 2011 et de m'avoir initié à l'Epigénétique et au concept de la DOHaD. Au cours de nos discussions passionnantes, j'ai appris énormément de choses, sur le plan scientifique et humain.

Un immense merci à Anne pour son encadrement qui m'a permis de me sentir responsabilisée et autonome mais aussi très soutenue. Tu as partagé tant de ton savoir-faire précieux avec moi, pour cela je suis très reconnaissante. Tu as partagé beaucoup de ton énergie avec moi quand j'en avais vraiment besoin. Je te remercie de tout mon cœur pour tes nombreux conseils très utiles pour moi, pour ta disponibilité que tu m'as accordée pendant les moments cruciaux du parcours (en vacances et en weekends des fois...). Il t'a fallu avoir beaucoup de patience par moments et je te remercie d'avoir donné des coups d'accélération quand c'était nécessaire. Enfin, merci pour la confiance et l'amitié que tu m'as témoignée depuis que je suis arrivée en stage de Master 2. Je te souhaite pleine réussite dans ta carrière de chercheur et dans ta vie personnelle.

Je ne serais pas arrivée au bout de cette thèse sans le soutien de tous les membres de l'ancienne équipe PROMEN et de la nouvelle équipe MECP2, à commencer par ceux qui sont déjà partis vers de nouveaux horizons (Laure, Qihan, Amandine, Marion, Hala, Michel, Alexandr...) ou qui resteront dans l'équipe après mon départ. Je remercie plus particulièrement Mélanie, qui a toujours été à l'écoute et disponible pour moi quand j'en avais besoin. Nous avons partagé plein de moments en commun dont je me souviendrai longtemps encore. J'ai toujours apprécié de travailler avec toi (merci pour toutes tes questions dites "existentielles") et je te souhaite une bonne continuation à l'INRA. Je remercie beaucoup Hélène pour son aide précieuse dans la rédaction du manuscrit et pour le partage de son expérience avec moi. J'espère que l'équipe MECP2 et ses recherches pourront se développer dans la direction que tu souhaites. Je remercie Sarah et Sara de contribuer au quotidien joyeux du laboratoire et pour votre soutien dans plusieurs aspects (partage d'expérience, correction des textes, votre humour, discussions de tout et de rien, vos talents culinaires...). Je remercie Sarah et Luc pour vos talents en statistique, efficacité dans votre travail et patience envers moi (surtout quand je reviens encore et encore avec mes questions, des fois très urgentes). J'adresse un merci à Audrey, pour ton amitié, soutien et professionnalisme technique. Je te souhaite une réussite pour ton diplôme et beaucoup de bonheur dans ta vie familiale. Je remercie également Marion pour une année passée dans notre équipe et pour le plaisir de te connaitre. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi et ton sens d'organisation et de réflexion scientifique. J'espère que ta thèse se passera à la hauteur de tes attentes et que nous allons nous croiser encore dans ce monde de recherche. Enfin, je remercie toutes les personnes de l'équipe qui m'ont aidé dans la préparation du manuscrit, des présentations et des posters au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire BDR et de son secrétariat, qui ont fait en sorte que cette partie de ma vie professionnelle soit très agréable. Je veux remercier très chaleureusement l'équipe ER1 de m'avoir toujours accueilli au coin café d'étage dit "rdc d'en bas" et l'équipe ER4, en particulier Pascale, Anne et Delphine. Merci à tous mes collaborateurs, avec qui j'ai eu de la chance de travailler et d'échanger au cours de cette thèse. Plus particulièrement, à l'équipe de laboratoire "Neurobiologie de l'Olfaction", avec qui nous avons partagé beaucoup de choses au cours de nos expériences sur notre modèle animal. Merci à Christine, Marie-Christine, Didier, Régine, Karine et Nicolas pour l'ambiance sympathique au long de ces années. Je remercie nos collaborateurs de l'Université de Lille, Christophe Breton et Simon Lecoutre, pour nos discussions très intéressantes autours de nos résultats qui m'ont toujours été utiles pour ma formation en Physiologie. Je remercie Nicolas Crapart et Claudia Bevilacqua de la plateforme BRIDGE-ICE de l'INRA. Nous avons découvert ensemble les joies de la technologie TLDA.

Merci aussi à tous mes collègues de l'Unité d'Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons de l'INRA, sans lesquels je n'aurais pas accompli ce grand travail sur nos souris "de la cellule 14". Pour citer Jérôme "... vous êtes les plus beaux, les plus forts et les plus magnifiques !" Jérôme, tu m'as permis de comprendre le français parlé à 200 mots par seconde. Charline, tu fais parties des belles rencontres que j'ai pu faire au cours de ma

thèse, et c'est toujours un réel plaisir de pouvoir discuter avec toi. Merci à vous pour ces heures de manip sans voir la lumière du jour. Grâce à vous, c'était tout de même un véritable plaisir, sans oublier un constant partage, humain et professionnel.

Je remercie tous les étudiant(e)s du laboratoire avec qui j'ai pu interagir : Maxime, Jean-Philippe, Marion, Delphine, Anne-Clémence, Matteo, Sarah V.-D., Clara, Amandine, Mouna, Audrey L., Caroline, Sofiane, Maëva, Sarah-Anne... Je tiens à dire que travailler à la BDR était très agréable pour moi, en partie grâce à vous. Je consacre un mot particulier à Audrey P., Sarah Valentino, Pauline P. et Pauline L. et Morgane en souvenir de nos voyages à la Baule et à St Brévin. Merci pour ces souvenirs agréables et riches. J'ai beaucoup apprécié ces nombreux échanges et ces bons moments passés en votre compagnie. Je remercie également Elina pour nos déjeuners et nos discussions en russe et pour son soutien quand j'en ai besoin. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse et bonne continuation.

J'adresse un grand MERCI à Stéphanie Corre, qui m'a énormément aidé au cours de ces derniers mois de thèse, dans la rédaction de mon manuscrit et dans ma progression en grammaire française, mais surtout en prononciation : "vent", "vingt" et "vin"... je vais essayer d'y arriver, même si cela prendra des années encore. Merci pour tout ce temps consacré à l'"ingestion" de tous ces petits bouts de *puzzle* scientifique peu compréhensibles parfois, qui forment à présent un seul manuscrit, et pas des plus courts. J'ai beaucoup appris avec vous, et maintenant mes phrases sont de moins en moins "russes". Merci de votre curiosité pour la science, j'espère vous avoir bien expliqué les grandes lignes de ce travail, et que les mots "épigénétique", "conditionnement développemental" ou encore "lobule hépatique" vous sont maintenant familiers. Je tiens à remercier bien d'autres gens qui ont énormément contribué à ma progression en français au quotidien (Anne, Guillaume, Mélanie, Sarah). Je suis partie de très loin et, grâce à vous, mon vocabulaire a explosé depuis ces dernières années. En commençant par les mots indispensables, pour finir par les chansons, films et phrases au sens figuré, sans oublier de nombreux textes que vous avez eu la gentillesse de corriger, vous avez beaucoup contribué à ma progression en français courant et professionnel. Nous avons bien ri sur les mélanges de mots et de phrases entières, que j'ai emprunté à votre langage.

Je réserve une place à part dans mes remerciements à mes nombreuses équipes du volley, grâce auxquelles j'ai pu échapper au stress lié à mon travail et me ressourcer quand j'en avais besoin. Merci à l'équipe de l'INRA de Jouy pour leur intérêt à ce sport passionnant, pour leur patience et leur écoute de mes conseils et mes explications des exercices. Merci pour la participation aux Adayades en 2014 dans le Jura, une expérience agréable et surprenante dont je vais garder un bon souvenir. Je remercie également les équipes féminines de Massy et de Fontenay-aux-Roses pour ces années de compétition passées ensembles. Je remercie mes amis avec qui nous avons fait tant de tournois et de matchs de *beach-volley* ensembles et qui ont supporté mes contraintes liées à ma thèse : Regina, Alek, Jo, Matthieu, Séb et Matteo. Surtout Matteo, avec qui j'ai trouvé autant d'intérêts communs, du volley à l'épigénétique, ce qui s'est traduit par une complicité amicale exceptionnelle. Je te souhaite une dernière année de thèse enrichissante, et de ne pas oublier le terrain de sport quand même.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Corinne Ferreira et Murielle Laquais, qui m'ont accompagné dans toutes mes démarches administratives, ainsi que Guillaume, Colette, Anne et Claudine. Sans vous mes nombreuses "histoires" de titres de séjour etc. auraient sûrement eu des issues encore plus compliquées. Je voudrais ne pas remercier la sous-préfecture de Palaiseau, mais plutôt toutes les personnes qui m'ont permis de limiter ce traumatisme et mener cette "bataille" à bien pour rester sur le territoire français sans interruption pendant ces 5 années.

Je remercie également toute ma famille, qui a toujours cru en moi et m'a soutenue, même en étant très loin. Je n'ai jamais eu assez de temps durant ces 3 dernières années (voire même, pas du tout) pour venir vous voir dans ma Sibérie natale enneigée (mon cher et tant aimé Akademgorodok) ou dans la Venise du Nord (St-Pétersbourg), froides et glaciales peut être, mais pleines de chaleur humaine, grâce à vous. Je vous promets de faire mieux et d'être plus présente pour la suite. Мама, Настя, мои дорогие бабушка и дедушка, vous êtes ma richesse personnelle et inestimable. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour et de ma profonde gratitude. Je remercie également Colette, Bernard et Florent, qui sont devenus ma famille par adoption, et sans qui je n'imagine plus mon quotidien désormais. Merci de cet accueil très agréable parmi vous, depuis 2011, et de votre soutien dans mes projets. Je suis ravie de partager de nombreux moments et de bons souvenirs avec vous.

Je n'aurai pas assez de mots pour exprimer ma reconnaissance à Guillaume, qui a toujours été à mes côtés, dès la décision de faire une thèse jusqu'à son aboutissement. Je ne serais pas arrivée jusque là sans toi. Tu arrivais toujours à me remotiver quand il le fallait et tu m'as beaucoup aidé de gérer ma fatigue et mon stress. Merci beaucoup de ton aide quotidienne précieuse et ton soutien moral. Beaucoup de souvenirs de cette période de thèse resteront entre nous deux.

Table des matières

INTRODUCTION 1

PREAMBULE 2

CHAPITRE I. OBESITE ET PERTE DE POIDS 3

1) L'EPIDEMIE D'OBESITE 3

1-1) Définition de l'obésité 3

1-2) Prévalence de l'obésité 4

1-2-1) Prévalence au niveau mondial 4

1-2-2) Prévalence en France 4

1-3) Risques associés à l'obésité 5

1-4) Origines et étiopathologie de l'obésité 6

1-4-1) Causes de l'obésité 6

1-4-2) Physiopathologie de l'obésité 7

2) L'OBESITE MATERNELLE DANS LE CADRE DU CONCEPT DES ORIGINES DEVELOPPEMENTALES DE LA SANTE ET DES MALADIES (DOHAD) 9

2-1) Définition de la DOHaD et premières preuves de concept 9

2-2) Preuves du conditionnement développemental induit par l'obésité maternelle chez l'homme 10

2-2-1) Prévalence de l'obésité chez les femmes 10

2-2-2) Complications pour la mère obèse et son enfant 11

2-2-3) Conditionnement du phénotype de l'individu par l'obésité maternelle 11

2-3) Modèles rongeurs de surnutrition / obésité maternelle dans le contexte de la DOHaD 13

2-3-1) Fenêtres critiques d'influence de l'obésité maternelle sur la descendance 16

2-3-2) Effets respectifs sur le phénotype de la descendance du régime hyperlipidique et de l'obésité maternelle 17

2-4) Mécanismes du conditionnement développemental par l'obésité maternelle 18

2-4-1) Altération des systèmes biologiques de la descendance par l'obésité maternelle. 18

2-4-2) Les mécanismes épigénétiques dans le concept de la DOHaD. 19

3) PERTE DE POIDS MATERNELLE PRECONCEPTIONNELLE ET EFFETS SUR LA DESCENDANCE 20

3-1) Recommandations aux femmes obèses avant d'entamer une grossesse 20

3-2) Effets de la perte de poids maternelle sur la santé des enfants 21

3-2-1) Perte de poids par chirurgie bariatrique chez les patientes atteintes d'obésité sévère 22

3-2-1) Perte de poids par une intervention nutritionnelle 23

3-2-2) Perte de poids par un exercice physique 27

CHAPITRE II. EPIGENETIQUE ET ENVIRONNEMENT 29

1) INTRODUCTION A L'EPIGENETIQUE ET PRINCIPALES MARQUES EPIGENETIQUES 29

2) MARQUES EPIGENETIQUES ET DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE 33

3) EPIGENETIQUE: LIEN ENTRE ENVIRONNEMENT ET GENOME 35

4) ACETYLATION DES HISTONES ET METABOLISME 37

4-1) Machinerie épigénétique impliquée dans la régulation de l'acétylation des histones 37

4-1-1) "Writers" de l'acétylation des histones : lysines acétyltransférases (KAT) 37

4-1-2) " Erasers " de l'acétylation des histones : lysines désacétylases (HDAC) 38

4-1-3) "Readers" de l'acétylation des histones : protéines à bromodomaine 38

4-2) L'implication des régulateurs de l'acétylation des histones dans le métabolisme et les pathologies métaboliques 39

4-2-1) Les lysines acétyltransférases 39

4-2-2) Les lysines désacétylases 40

4-2-3) Les protéines à bromodomaine 43

5) IMPLICATION DES MECANISMES EPIGENETIQUES DANS LE CONCEPT DE LA DOHAD 44

5-1) Régulation épigénétique du récepteur aux glucocorticoïdes et DOHaD 44

5-2) Altérations épigénétiques et le conditionnement du diabète 46

5-3) Altérations épigénétiques des régulateurs de l'appétit et DOHaD 47

5-4) Altérations épigénétiques des facteurs de transcription impliqués dans le développement des tissus métaboliques 48

5-5) L'acétylation des histones, une restriction de croissance fœtale et le conditionnement du phénotype adulte ... *49*
5-6) Conclusions ... *50*

CHAPITRE III. ORGANES CIBLES DU CONDITIONNEMENT DEVELOPPEMENTAL ... **52**

1) OVOCYTES: MEDIATEURS DES EFFETS MATERNELS PRECONCEPTIONNELS SUR LE PHENOTYPE DE LA DESCENDANCE ... **53**
1-1) Effets de l'obésité maternelle sur les ovocytes ... *53*
1-2) Altérations épigénétiques dans les ovocytes ... *55*
2) PLACENTA ... **56**
2-1) Morphologie du placenta chez la souris ... *56*
2-1-1) Les trois zones fonctionnelles du placenta murin ... 56
2-1-2) Comparaison de la morphologie du placenta chez l'homme et chez la souris ... 57
2-2) Rôle du placenta dans le développement embryonnaire ... *58*
2-2-1) Fonction nutritionnelle du placenta ... 58
2-2-2) Fonction endocrine du placenta. ... 59
2-2-3) Fonction immunitaire du placenta ... 60
2-2-4) Conclusions sur les fonctions du placenta ... 60
2-3) Développement placentaire chez la souris ... *60*
2-3-1) Implantation du blastocyste et cellules trophoblastiques ... 60
2-3-2) Formation du labyrinthe et de la zone jonctionnelle chez la souris ... 61
2-3-3) Formation de la décidue maternelle ... 61
2-3-4) Gènes impliqués dans le développement placentaire ... 61
2-4) Epigénétique placentaire ... *62*
2-4-1) Méthylation de l'ADN ... 62
2-4-2) Modifications des histones ... 64
2-5) Influence de l'obésité maternelle sur le fonctionnement du placenta ... *66*
2-5-1) Effet de l'obésité sur la morphologie du placenta ... 66
2-5-2) Obésité et état lipotoxique et inflammatoire dans le placenta ... 67
2-5-3) L'obésité et le transport placentaire des macronutriments ... 68
2-5-4) Réponses différentes à l'environnement maternel obésogène dans les placentas des fœtus mâles et femelles ... 69
2-6) Rôle du placenta dans le conditionnement de la santé de l'individu ... *70*
2-6-1) Conséquences de l'altération du fonctionnement placentaire sur la santé à long terme ... 70
2-6-2) Mécanismes épigénétiques de la DOHaD dans le placenta ... 71
3) LE FOIE ... **75**
3-1) Morphologie et organisation fonctionnelle du foie à l'âge adulte ... *75*
3-2) Développement du foie in utero ... *76*
3-3) Fonction hépatique au cours du développement fœtal chez la souris et chez l'homme ... *78*
3-3-1) Fonction hématopoïétique chez le fœtus ... 78
3-3-2) Installation de la fonction métabolique chez le fœtus ... 79
3-4) Rôle central du foie pendant la vie adulte ... *80*
3-4-1) Métabolisme glucidique dans le foie ... 80
3-4-2) Métabolisme lipidique hépatique ... 81
3-4-3) Contrôle hormonal du métabolisme énergétique ... 82
3-5) Altération du foie dans le cas d'obésité / diabète ... *83*
3-5-1) La stéatose et l'hépatite stéatosique non alcooliques ... 83
3-5-2) Etiologie de la stéatose hépatique ... 83
3-5-3) Mécanismes épigénétiques impliqués dans la stéatose hépatique ... 84
3-6) Lien entre rythmes circadiens et métabolisme ... *85*
3-6-1) Dialogue entre l'horloge circadienne et le métabolisme énergétique ... 85
3-6-3) Rythmes circadiens dans le foie fœtal chez la souris ... 86
3-7) Programmation développementale dans le foie par la physiologie de la mère ... *87*
3-7-1) Effets de la nutrition maternelle sur le phénotype hépatique des descendants adultes ... 87
3-7-2) Mécanismes de la programmation développementale du métabolisme hépatique ... 88
3-7-3) Perturbations hépatiques *in utero* par une nutrition hyperlipidique maternelle ... 92

RESULTATS 94

OBJECTIFS DE LA THESE 95

ARTICLE 1 96

EXPRESSION OF EPIGENETIC MACHINERY GENES IS SENSITIVE TO MATERNAL OBESITY AND WEIGHT LOSS IN RELATION TO FETAL GROWTH 96

INTRODUCTION 97
RESULTATS ET CONCLUSIONS 98
ABSTRACT 101
BACKGROUND 102
RESULTS 103
DISCUSSION 106
CONCLUSIONS 111
METHODS 111
ADDITIONAL FILES 116
REFERENCES 121

ARTICLE 2 125

A MOUSE MODEL TO STUDY THE EFFECTS OF MATERNAL PRECONCEPTIONAL WEIGHT LOSS AFTER DIET-INDUCED OBESITY ON THE METABOLIC RISK OF THE OFFSPRING 125

INTRODUCTION 126
RESULTATS ET CONCLUSIONS 126
INTRODUCTION 128
METHODS 128
RESULTS AND DISCUSSION 130
CONCLUSIONS 132
REFERENCES 133

DISCUSSION 135

1) MISE EN PLACE D'UN MODELE MURIN D'ETUDE DES TRAJECTOIRES PONDERALES MATERNELLES 136
1-1) Modèle murin et résultats en période préconceptionnelle 136
1-1-1) Hypothèses du travail et protocole expérimental 136
1-1-2) Composition du régime hyperlipidique utilisé 137
1-1-3) Fenêtres critiques d'exposition choisies et phénotype des femelles en période préconceptionnelle 137
1-2) Limites du modèle 138
2) EFFETS A COURT TERME 139
2-1) Résultats 139
2-1-1) Obésité maternelle : restriction de croissance fœtale 139
2-1-2) Perte de poids préconceptionnelle : restauration partielle de la croissance fœtale 139
2-1-3) Altérations transcriptionnelles dans le placenta et le foie fœtal induites par l'obésité et la perte de poids maternelle 140
2-2) Limites de notre étude sur les effets à court terme 142
2-2-1) Approche utilisée 142
2-2-2) Hétérogénéité cellulaire dans les organes cibles 142
2-3) Perspectives 143
2-3-1) Rôle de l'acétylation des histones dans le contexte de l'obésité et la perte de poids maternelle 143
2-3-2) Lien de cause à effet : marques épigénétiques et restriction de croissance 143
2-3-3) Altérations morphologiques et fonctionnelles du foie fœtal et du placenta 144
2-3-2) Transposition à la pathologie humaine 145
3) EFFETS A LONG TERME 146
3-1) Résultats 146
3-1-1) Effets de l'obésité maternelle sur le phénotype de la descendance avant le sevrage 146
3-1-2) Effets de l'obésité maternelle sur le phénotype de la descendance à l'âge adulte 146
3-1-3) Effets de la perte de poids préconceptionnelle maternelle sur le phénotype de la descendance 147
3-2) Limites de notre étude sur les effets à long terme 148
3-2-1) Effets de la lactation sur le phénotype des descendants 148

3-2-2) Puissance statistique de l'étude à long terme 148
3-2-3) Mortalité néonatale et lien avec comportement maternel et mise en place de la lactation..... 149
3-3) Perspectives..... 150
3-3-1) Effets des trajectoires pondérales maternelles sur le comportement alimentaire, le système cardio-vasculaire et l'anxiété 150
3-3-2) Effets transgénérationnels des trajectoires pondérales maternelles et mécanismes épigénétiques sous-jacents 151
4) COMPARAISON DES COHORTES A COURT ET A LONG TERME..... 153
5) CONCLUSIONS GENERALES 154

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....156

ARTICLES 3 A 8 176

ANNEXES.....177

Liste des abréviations

α-MSH - α-melanocyte-stimulating hormone
Actβ - actin beta
ADN - acide désoxyribonucléique
AG - acides gras
AGRP - agouti-related protein (protéine agouti)
AID/APOBEC - activation-induced cytidine deaminase / apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
AMPK - AMP-activated protein kinase (protéine kinase activée par l'AMP)
ANOVA - analysis of variance (analyse de la variance)
ARN – acide ribonucléique
ATP - adénosine-5′-triphosphate
Bdnf - brain derived neurotrophic factor
BET - bromodomain and extraterminal domain
Brd - bromodomain protein
CD - control diet (régime contrôle)
Cebp - CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)
ChIP – chromatin Immunoprecipitation (immunoprécipitation de la chromatine)
chRebp - carbohydrate response element-binding protein
Clock - circadian locomotor output cycles kaput
CpG – dinucléotide cytosine–phosphate–guanine
Creb - cAMP-responsive element binding protein
Ct - threshold cycle
CTRL - control
Dnmt - DNA methyltransferase
DOHaD - developmental origins of health and disease (origines développementales de la santé et des maladies)
E18.5 - jour embryonnaire 18.5
Eif4a2 - eukaryotic translation initiation factor 4A2
FATP1 - fatty acid transport protein 1
FGR - fetal growth restriction (restriction de croissance fœtale)
Foxo1 - forkhead box protein O1
FPI - fetal weight-to-placental weight ratio index (rapport fœto-placentaire)
GABA – γ-aminobutyric acid (acide γ-aminobutyrique)
Gapdh - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gck - glucokinase
GLUT - glucose transporter
GNAT - Gcn5-related histoneN-acetyltransferases
GR - glucocorticoid receptor
GRE - glucocorticoid response elements
GWAS - genome-wide association study (étude d'association pangénomique)
H3 - histone 3
HAT – histone
Hdac - histone désacetylase
HDL - high density lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
HDM - histones déméthylases
Hsd11β - hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase

HFD - high-fat diet (régime hyperlipidique)
HMT - histones méthyltransférases
Hnf4α - hepatocyte nuclear factor 4α
HS – high sugar (hyperglycidique)
ICM – internal cellular mass
IMC - indice de masse corporelle
IOM - Institute of Medicine
Irs1 - insulin receptor substrate 1
IUGR - intra-uterine growth retardation (retard de croissance intra-utérin)
Jarid - jumonji AT rich interactive domain
K9/14/18 - lysine 9 / lysine 14 / lysine 18
Kat - lysine acétyltransférase
Kdm - lysine demethylase
Kmt - lysine méthyltransférase
LGA - large for gestational age (grand pour l'âge gestationnel)
Lxr - liver X receptor
MAPK - mitogen-activated protein kinase
Mbd - methyl binding domain
Mecp2 - methyl CpG binding protein 2
MR - minéralocorticoïdes
Mrpl32 - mitochondrial ribosomal protein L32
NA - non amplifié
NAFLD - non-alcoholic fatty liver disease
NASH - non-alcoholic steatohepatitis
NDA - nicotinamide adénine dinucléotide
NPY - neuropeptide Y
OB - obèse
OGTT: oral glucose tolerance test (test oral de tolérance au glucose)
OMS - Organisation Mondiale de la Santé
P_{adj} - adjusted p-value (p-value ajustée)
PCAF - P300/CBP-associated factor
PEPCK - phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGC - primordial germ cells
Pgc1α - peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α
PLP-A - prolactin-like protein-A
PMD - partially methylated demain
POMC - proopiomélanocortine
Pparα - peroxisome proliferator activated receptor alpha
Prmt - protein arginine N-methyltransferase
qPCR - quantitative polymerase chain reaction
RCIU - retard de croissance intra-utérin
RT - reverse transcription
RXR -retinoid X receptor
SAGA - Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase
SAM - S-adenosyl-methionine
Sdha - succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein
SGA - small for gestational age (petit pour l'âge gestationnel)
SIRT - sirtuin
SNC - système nerveux central
SNP - single-nucleotide polymorphism (polymorphisme d'un seul nucléotide)

SRC - steroid receptor coactivators
Srebp1c - sterol regulatory element-binding protein-1c
STM - septum transversum mesenchyme
SWI/SNF - SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TAB - tissu adipeux blanc
Tbp - TATA box binding protein
TDG/SMUG1 - thymine DNA glycosylase/singlestrand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase
Tet - tet methylcytosine dioxygenases
TG - triglycéride
TLDA: TaqMan low density array
Tph1 - tryptophan hydroxylase 1
Utx - ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, X chromosome
Uty - ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome
VLDL - very low density lipoprotein
WL - weight loss
ZJ – zone jonctionnelle
18S - eukaryotic 18S rRNA
5hmC - 5-hydroxyméthylcytosine
5mC - 5-méthylcytosine

Index des figures et des tableaux

Introduction

Figure 1. Prévalence de l'obésité (IMC ≥ 30 kg/m2) dans le monde chez les hommes (A) et chez les femmes (B) âgées de plus de 20 ans en 2013 4
Figure 2. Résultats de l'enquête nationale française ObEpi (Roche) sur la prévalence de l'obésité, menée en 2012 5
Figure 3. Prévalence de l'obésité par région administrative et son évolution depuis 1997 selon l'étude ObEpi (Roche) 2012 5
Figure 4. Régulation de l'homéostasie énergétique par les facteurs périphériques dans l'hypothalamus 7
Figure 5. Composition cellulaire du tissu adipeux blanc 8
Figure 6. Fonction altérée du tissu adipeux blanc (TAB) en cas d'obésité 8
Figure 7. Prévalence de l'obésité (IMC ≥ 30 kg/m2) chez la femme adulte en fonction de l'âge en France 11
Figure 8. Fenêtres critiques d'influence de l'obésité maternelle sur la descendance 16
Figure 9. Effets de la nutrition hyperlipidique et/ou de l'obésité maternelle sur organogenèse 19
Figure 10. La réaction de méthylation de l'ADN 29
Figure 11. Les différents rôles des ADN méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3a/3b 29
Figure 12. Distribution des cytosines méthylées dans le génome 29
Figure 13. Les mécanismes de la déméthylation de l'ADN 30
Figure 14. Les marques épigénétiques qui régulent la transcription génique 30
Figure 15. Les modifications post-traductionnelles des histones 31
Figure 16. La régulation de la transcription génique par des marques épigénétiques 31
Figure 17. « Writers », « erasers » et « readers » des marques épigénétiques 31
Figure 18. La régulation de l'expression génique par la machinerie épigénétique 32
Figure 19. Comparaison de la dynamique de méthylation du génome au cours du développement entre la souris (A) et l'homme (B) 33
Figure 20. Reprogrammation épigénétique du génome paternel et maternel après la fécondation 33
Figure 21. Altérations de la conformation de la chromatine paternelle après la fécondation et jusqu'au stade blastocyste 33
Figure 22. Mécanismes reliant les facteurs environnementaux à des modifications épigénétiques 35
Figure 23. Mécanismes reliant le statut nutritionnel de l'organisme et l'acétylation des histones 36
Figure 24. Réactions d'acétylation des histones par les lysine acétyltransférases (KATs) et de désacétylation par les lysine désacétylases (HDACs) et les Sirtuines 36
Figure 25. Arbres phylogénétiques des lysine acétyltransférases (A), KATs, et histone désacétylases, HDACs (B) et Sirtuins (C) 37
Figure 26. Classification, domaines catalytiques et substrats des histone désacétylases (HDAC et Sirtuines) 38
Figure 27. Domaines de reconnaissance des marques épigénétiques et recrutement des protéines aux histones 38
Figure 28. Arbre phylogénétique des 8 familles de protéines à bromodomaine chez l'homme 39
Figure 29. Régulation du métabolisme glucidique par les histone désacétylases (HDAC) de classe II 41
Figure 30. Fonctions de SIRT1 dans le métabolisme énergétique 41
Figure 31. Complexe BRD8 / p400 / PPARγ / RXR qui régule l'expression des gènes cibles de PPARγ au cours de la différenciation des adipocytes chez la souris 43
Figure 32. Altérations épigénétiques progressives au niveau du promoteur de Pdx1 dans les cellules β pancréatiques des rats, ayant subi un RCIU, durant l'installation du diabète de type 2 46
Figure 33. Mécanismes potentiels conduisant à la modification des marques épigénétiques dans les ovocytes, induite par la perte de poids 55
Figure 34. Morphologie du placenta murin 56
Figure 35. Structure du barrière fœto-placentaire dans le labyrinthe chez la souris 56

Figure 36. Comparaison de la morphologie du placenta et de la barrière placentaire chez l'homme et chez la souris 57
Figure 37. Circulation du sang fœtal (A) et maternel (B) dans le placenta chez l'homme 58
Figure 38. Le transport du glucose, des acides aminés et des acides gras à travers la barrière placentaire chez l'homme 59
Figure 39. Fonction paracrine et endocrine des cellules trophoblastiques géantes 59
Figure 40. Développement du placenta murin 60
Figure 41. Dimorphisme sexuel et effet du régime maternel hyperlipidique pendant la gestation sur l'expression génique dans le placenta murin à E15.5 70
Figure 42. Circulation du sang au niveau du foie et organisation du lobule hépatique 75
Figure 43. Structure et organisation cellulaire d'une section d'un lobule hépatique dans le foie adulte 75
Figure 44. La différenciation des lignages cellulaires hépatiques chez la souris 76
Figure 45. Morphogenèse hépatique chez la souris 76
Figure 46. Vue transversale de la formation du bourgeon hépatique au cours du développement murin 77
Figure 47. Les sites d'hématopoïèse au cours du développement chez la souris et chez l'homme 79
Figure 48. Schéma du métabolisme lipidique et glucidique dans l'hépatocyte 81
Figure 49. Contrôle hormonal du métabolisme hépatique 82
Figure 50. Conditionnement développemental de la susceptibilité à la stéatose hépatique 87

Discussion

Figure 51. Hypothèse des effets des trajectoires pondérales maternelles sur les organes cibles, avec un impact sur le développement fœtal et une prédisposition aux maladies métaboliques à l'âge adulte 137
Figure 52. Le modèle des effets des trajectoires pondérales maternelles sur les organes cibles, avec un impact sur le développement fœtal et une prédisposition aux maladies métaboliques à l'âge adulte 137
Figure 53. Augmentation de l'expression du transporteur de sérotonine (Slc6a4) dans les placentas des souris diabétiques à E10.5 142
Figure 54. Relations de causes à effets possibles entre l'exposition environnementale, des altérations épigénétiques et le phénotype 143
Figure 55. Cinétique possible de régulation de la machinerie épigénétique et sa marque cible dans le temps, suite à un facteur environnemental délétère 143

Tableaux

Tableau 1. Effet du régime hyperlipidique (HFD) chez la mère sur le phénotype des descendants chez les rongeurs 14
Tableau 2. Prise de poids recommandée au cours de la grossesse, en fonction de l'IMC préconceptionnel 20
Tableau 3. Métabolites co-facteurs ou substrats des enzymes épigénétiques 35
Tableau 4 : Les lysine acétyl-transférases (KAT) 37
Tableau 5. Modifications cibles des protéines à bromodomaines chez l'homme et la souris 39
Tableau 6. Composition des régimes contrôle (CD) et hyperlipidique (HFD) en % de calories totales. La composition en lipides est indiquée en % calorique du sous-total des acides gras 138
Tableau 7. Effets du régime hyperlipidique (HFD) chez la mère sur le poids fœtal chez la souris 139

Annexes

Tableau I. Effet de l'intervention nutritionnelle sur le phénotype de la descendance
Tableau II. Implication de la machinerie de l'acétylation des histones dans les processus métaboliques
Tableau III. Les gènes cibles fréquemment étudiés dans le contexte de la DOHaD
Tableau IV. Effets de l'obésité et la surnutrition maternelle sur le transport placentaire
Tableau V. Connaissances actuelles sur le conditionnement du phénotype hépatique par l'alimentation maternelle

INTRODUCTION

Préambule

Un nouveau paradigme des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD), dernières 30 années, a changé notre compréhension des maladies chroniques. Avant des travaux du laboratoire de Dr Barker, les maladies tels que l'obésité, le diabète de type 2 et les pathologies cardiovasculaires s'appelaient "non-transmissibles". Or, grâce à une contribution de plusieurs travaux sur les cohortes humaines et sur les modèles animaux, une transmission à la descendance de la prédisposition aux telles maladies est possible. Il est aujourd'hui admis que l'exposition aux facteurs environnementaux *in utero*, voire en période préconceptionnelle, conditionne le phénotype d'un individu à long terme. L'épigénétique émerge en tant qu'un des mécanismes sous-jacents de ce phénomène, permettant la "mémorisation" des effets de l'environnement précoce. Les études portant sur le rôle des processus épigénétiques dans le cadre de la DOHaD ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de l'explosion de l'obésité dans le monde durant dernières décennies.

Le laboratoire du Pr Claudine Junien, dans lequel j'ai réalisé mes travaux, s'intéresse depuis une dizaine d'années à l'épigénétique environnementale dans le contexte de la DOHaD. Ce travail de thèse vise à explorer les effets de l'obésité maternelle sur le phénotype de la descendance, à court et à long terme. Afin de savoir si la perte de poids en amont de la conception pouvait avoir des effets bénéfiques / négatifs sur la santé de la descendance, nous avons mis en place un nouveau modèle murin, en utilisant une approche nutritionnelle. Les travaux de cette thèse révèlent une réponse transcriptionnelle aux trajectoires pondérales des gènes impliqués dans l'acétylation des histones dans le placenta et le foie fœtal au terme de la gestation. Des altérations épigénétiques pourraient avoir un impact sur le transcriptome dans ces organes et, par conséquent, sur une construction du phénotype.

Afin de mieux appréhender les travaux de cette thèse, j'aborderai dans cette introduction bibliographique un premier chapitre traitant les effets de l'obésité et de la perte de poids maternelle sur la descendance à long terme. Dans un second chapitre, je vais présenter les mécanismes épigénétiques et leur lien avec l'environnement métabolique. Etant donné la forte réponse de la machinerie d'acétylation des histones, observée dans notre étude, ce chapitre sera particulièrement consacré aux "*writers*", "*erasers*" et "*readers*" de l'acétylation des histones. Enfin, je vais terminer cette introduction par un chapitre dédié à l'état des connaissances concernant les effets de l'obésité maternelle sur les processus épigénétiques dans le placenta et le foie dans le contexte de la DOHaD.

Chapitre I. Obésité et perte de poids

1) L'épidémie d'obésité

1-1) Définition de l'obésité

L'obésité est aujourd'hui considérée comme l'un des principaux problèmes de santé publique, formellement qualifiée d'épidémie, depuis 1997, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'OMS définit l'obésité comme :

"une accumulation anormale ou excessive de masse grasse qui représente un risque pour la santé".

Le degré d'obésité s'évalue grâce à **l'indice de masse corporelle** (IMC), calculé comme le ratio entre le poids et le carré de la taille et exprimé en kg/m^2. Un IMC compris entre 18,5 et 24,9 kg/m^2 correspond à une corpulence normale. Lorsque son IMC est compris entre 25 et 29,9 kg/m^2, le sujet est **en surpoids** et lorsqu'il est égal ou supérieur à 30 kg/m^2, **obèse** (OMS). L'IMC permet de diagnostiquer et de classifier l'obésité en trois degrés de gravité : modérée ($30 \leq IMC < 34,9\ kg/m^2$), sévère ($35 \leq IMC < 39,9\ kg/m^2$) et morbide ($IMC \geq 40\ kg/m^2$). L'IMC donne toutefois "une indication approximative car il ne correspond pas forcément au même degré d'adiposité d'un individu à l'autre" (OMS).

L'obésité est souvent associée au **syndrome métabolique**. Le syndrome métabolique est cliniquement diagnostiqué lorsque l'obésité abdominaleest présente (un tour de taille élevé, ≥ 102 cm chez les hommes et ≥ 88 cm chez les femmes) et qu'au moins deux des quatre critères suivants sont présents (International Diabetes Federation, 2006) (Lee and Koren, 2010):

- ✓ des concentrations en **triglycérides** (TG) élevées (≥ 150 mg/dl) ;
- ✓ une diminution du **HDL-cholestérol** (high density lipoprotein) (< 40 mg/dl pour les hommes et < 50 mg/dl pour les femmes) ;
- ✓ une **pression** sanguine élevée (pression systolique ≥ 130 ou diastolique ≥ 85 mm Hg) ;
- ✓ une **glycémie** à jeun élevée (≥ 100 mg/dl).

Pour le syndrome métabolique, mais aussi pour bien d'autres pathologies, il existe des **différences entre les hommes et les femmes**, comme par exemple, la distribution du tissu adipeux. Ainsi, l'obésité est dite **gynoïde** chez la femme, dont l'excès de tissu adipeux blanc

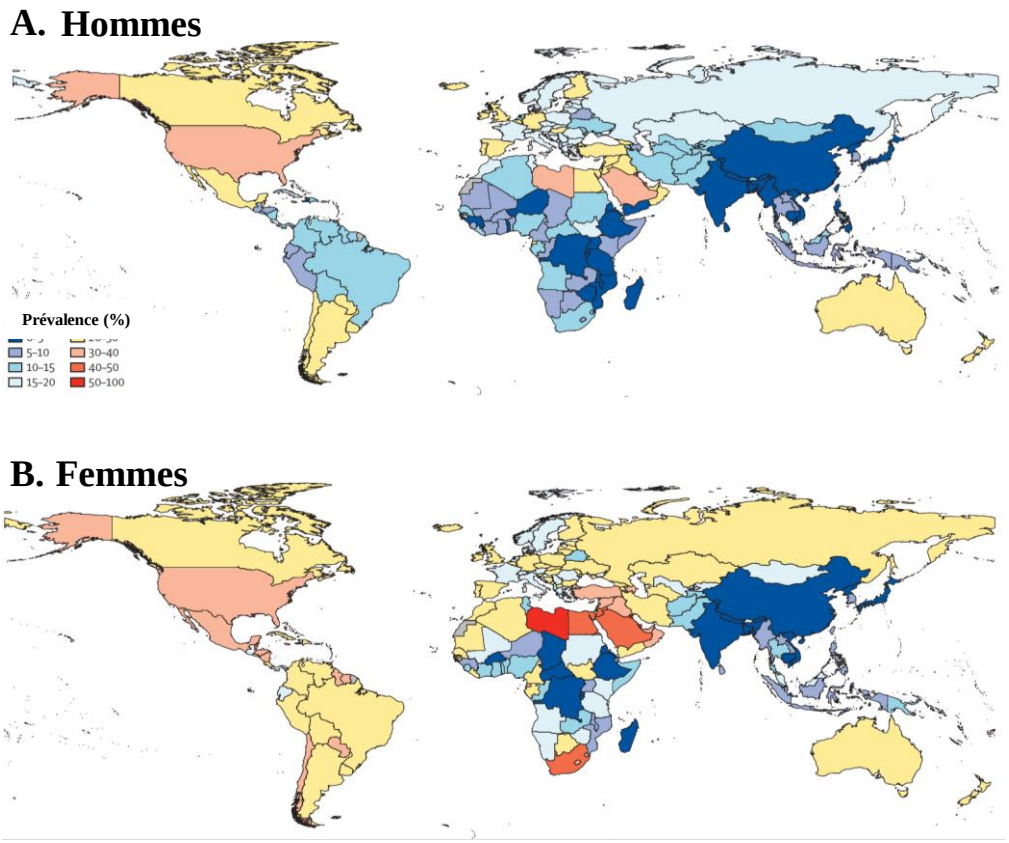


Figure 1. Prévalence de l'obésité (IMC ≥ 30 kg/m2) dans le monde chez les hommes (A) et chez les femmes (B) âgées de plus de 20 ans en 2013

Prévalence chez les femmes : 38%. Prévalence chez les hommes : 36,9%

IMC – indice de masse corporelle.

Adapté de Ng et al. 2014

(TAB) se situe principalement au niveau des cuisses, au niveau du TAB sous-cutané. Chez l'homme, l'obésité est principalement **androïde**, c'est-à-dire que l'excès de graisses se répartit principalement sur l'abdomen (Bloor and Symonds, 2014).

1-2) Prévalence de l'obésité

1-2-1) Prévalence au niveau mondial

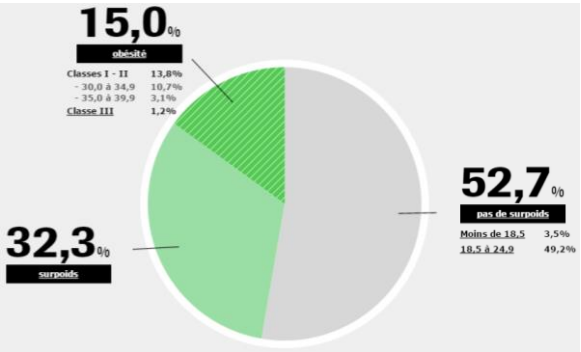
Selon *The Institute for Health Metrics and Evaluation*, un centre de recherche de l'université de Washington, la prévalence de l'obésité et du surpoids ont considérablement augmenté entre 1980 et 2013 : le nombre de personnes avec un IMC ≥ 25 kg/m^2 est passé de 857 millions à 2.1 milliards (Ng, 2014). Au cours de cette période, la prévalence de l'obésité a évolué de 8% dans le monde, soit **671 millions de personnes obèses**. En 2013, sur l'ensemble de la population mondiale, la prévalence de l'obésité était de **36,9% chez les hommes** et de **38% chez les femmes** (Figure 1). Les 10 pays où vivent le plus grand nombre de personnes obèses sont les Etats-Unis, la Chine, l'Inde, la Russie, le Brésil, le Mexique, l'Egypte, l'Allemagne, le Pakistan et l'Indonésie. L'augmentation de la prévalence de l'obésité a lieu non seulement dans les pays industrialisés, mais surtout dans les pays émergents, où sont concentrés 62% des sujets obèses (Ng, 2014).

Selon cette étude, **l'obésité représente une pandémie** qui gagne de plus en plus de terrain. La situation est alarmante chez les enfants. Dans les pays développés, 16,9% des garçons et 16,2% des filles étaient en surpoids ou obèses en 1980. Cette proportion a depuis augmenté, atteignant respectivement 23,8% et 22,6% en 2013 (Ng, 2014). Dans les pays émergents, une augmentation a également été observée sur la même période : de 8,1% à 12,9% chez les garçons et de 8,4% à 13,4% chez les filles. Au total, l'OMS a estimé, qu'en 2013, environ **42 millions d'enfants** de moins de 5 ans étaient en surpoids ou obèses dans le monde (OMS).

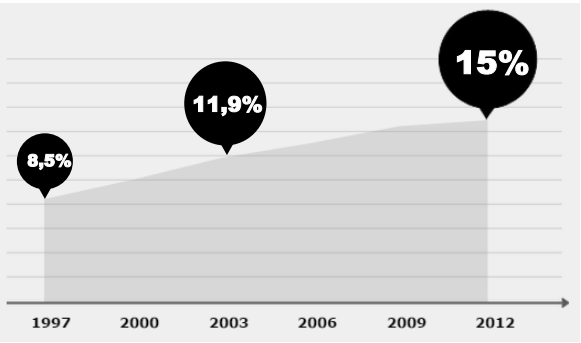
1-2-2) Prévalence en France

Depuis 1997, l'enquête nationale ObÉpi analyse tous les trois ans la prévalence du surpoids et de l'obésité en France. En 2012, 32,3% des Français adultes étaient en surpoids (25 ≤ IMC < 30 kg/m^2) et 15% obèses (IMC ≥ 30 kg/m^2) (ObEpi-Roche, 2012) (Figure 2A). Au total, **47,3% de la population française sont en surpoids ou obèses en 2012**. Le pourcentage

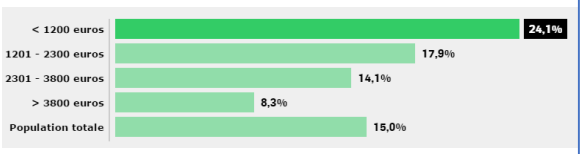
A. Prévalence de l'obésité et du surpoids en France



B. Prévalence de l'obésité entre 1997 et 2012



C. Comparaison en fonction des revenus du ménage



D. Proportion des complications métaboliques et cardiovasculaires

		cholestérol	diabète	HTA	suite à un infarctus	insuffisance cardiaque
Population générale :	15,9%	5,8%	17,6%	1,7%	2,2%	
Population obèse :	21,5%	13,5%	28,8%	2,3%	2,9%	

Figure 2. Résultats de l'enquête nationale française ObEpi (Roche) sur la prévalence de l'obésité, menée en 2012

(A) Prévalence de l'obésité (selon le classe, IMC ≥ 30 kg/m^2) et du surpoids (25 ≤ IMC < 30 kg/m^2) au niveau national en 2012.

(B) Évolution de la prévalence de l'obésité en France de 1997 à 2012. Le nombre de personnes obèses s'élève à 6 922 215 en 2012, soit 15% de la population.

(C) Comparaison en fonction des revenus du ménage

(D) Augmentation de la proportion des complications métaboliques et cardio-vasculaires dans la population obèse par rapport à la population générale. HTA – hypertension artérielle

Adapté de ObEpi (Roche) 2012

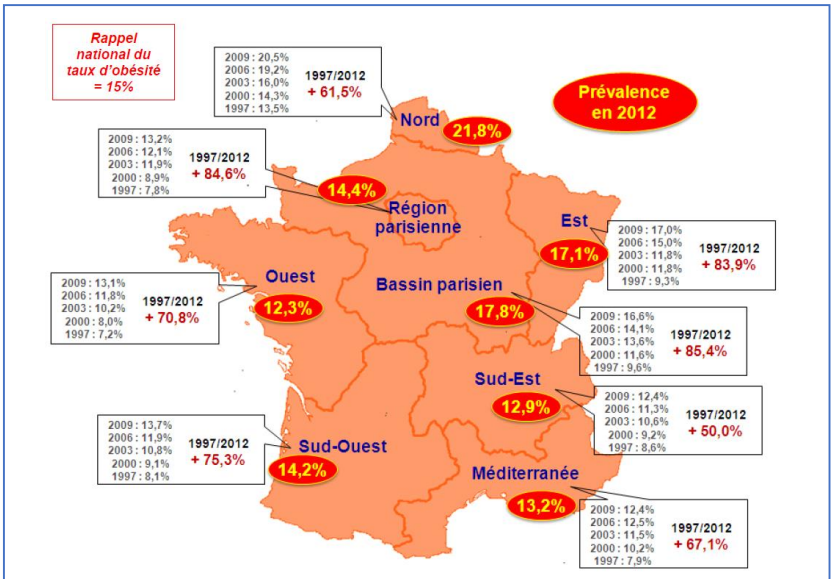


Figure 3. Prévalence de l'obésité par région administrative et son évolution depuis 1997 selon l'étude ObEpi (Roche) 2012

de Français sans surpoids est passé de 62% en 1997 à 53% en 2012. Entre 1997 et 2012, l'IMC moyen en France est passé de 24,3 à 25,4 kg/m^2. L'augmentation relative de la prévalence de l'obésité est de + 76% depuis 1997 : **le nombre de personnes obèses** est passé de 8,5% à **15% en 2012** (Figure 2B). Quant à la prévalence de l'obésité morbide (classe III, IMC ≥ 40 kg/m^2), elle est passée, sur ce même laps de temps, de 0,3% de la population à 1,2%.

En 2012, la prévalence de l'obésité est **plus élevée chez les femmes (15,7%)** que chez les hommes (14,3%). Avant 55 ans, l'obésité féminine est plus importante que l'obésité masculine, mais, passé l'âge de la ménopause, cette tendance s'estompe. Avec l'âge, la prévalence de l'obésité augmente régulièrement chez les deux sexes (ObEpi-Roche, 2012). De manière intéressante, le niveau de revenus du ménage est inversement corrélé à la prévalence de l'obésité (Figure 2C). En 2012, il existe des inégalités au niveau de la prévalence de l'obésité entre les régions administratives françaises (Figure 3). On observe un gradient décroissant Nord - Sud (21,3% dans le Nord-Pas de Calais et 11,6% dans Midi-Pyrénées) et Est – Ouest (18,6% en Alsace et 12,0% en Bretagne). Pour la période étudiée, les régions qui connaissent les plus fortes augmentations en 15 ans sont l'Alsace, la Champagne-Ardenne et l'Ile-de-France (ObEpi-Roche, 2012).

Globalement, en France, l'obésité est un problème majeur de santé publique, en constante augmentation, qui touche les deux sexes et toutes les générations.

1-3) Risques associés à l'obésité

L'obésité, **cinquième facteur de risque de décès** au niveau mondial selon l'OMS, a de graves conséquences sur la santé de l'individu. L'obésité est un important **facteur de risque pour de nombreuses maladies chroniques** : les maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, insuffisance cardiaque, infarctus du myocarde), les accidents vasculaires cérébraux, le diabète de type 2, la dyslipidémie (le taux élevé de cholestérol et des triglycérides (TG)), l'apnée du sommeil et les problèmes respiratoires, la stéatose hépatique, l'arthrose (une dégénérescence des articulations), certains cancers (de l'endomètre, du sein et du côlon) (ObEpi-Roche, 2012; OMS) (Figure 2D).

Chez l'enfant, l'obésité est associée à un risque accru de décès prématuré selon l'OMS. Hormis le risque élevé de rester obèse à l'âge adulte, **les enfants obèses encourent de nombreux problèmes de santé** : difficultés respiratoires, risque de fracture osseuse, altérations

cardio-vasculaires, hypertension artérielle, résistance à l'insuline, dyslipidémie et inflammation (Ayer et al., 2015; Chang et al., 2015; Pollock, 2015).

1-4) Origines et étiopathologie de l'obésité

1-4-1) Causes de l'obésité

La prévalence croissante de l'obésité, maladie multifactorielle, est en grande partie due à des **causes environnementales**, à savoir des habitudes modifiées en matière d'alimentation et d'exercice physique. Dans les pays industrialisés, tout comme dans les pays émergents, le mode de vie a en effet considérablement évolué au cours des dernières décennies. La consommation d'**aliments très caloriques**, riches en lipides saturés et glucides simples, a considérablement augmenté, tandis que **l'activité physique** a diminué et ce, en raison de la nature sédentaire du travail et de l'évolution des modes de transport (OMS). Un tel environnement, favorisant le développement de l'obésité, est qualifié d'"obésogène". D'autres facteurs environnementaux contribueraient à l'obésité : **stress**, perturbations des rythmes du sommeil, taux élevé de perturbateurs endocriniens dans l'environnement, modification de la composition de la flore intestinale (McAllister et al., 2009). Le travail en horaires décalés et le manque de sommeil provoquent **une perturbation des cycles circadiens**, ayant pour conséquence le développement de l'obésité (Karlsson et al., 2001).

L'environnement n'est pas le seul facteur contribuant à l'obésité : cette pathologie résulterait des **interactions complexes entre facteurs génétiques et environnementaux** (Yazdi et al., 2015). La carte génétique de l'obésité est publiée, basée sur des cas d'obésité monogénique chez l'homme (causée par la mutation d'un seul gène), sur des études d'invalidation génique ou de surexpression chez la souris et sur des études d'association pangénomiques (GWAS pour *genome-wide association study*) (Locke et al., 2015; Rankinen et al., 2006). Les cas d'obésité monogénique, une forme très sévère et précoce de l'obésité, restent extrêmement rares (Fall and Ingelsson, 2014). Afin de comprendre des origines de l'obésité polygénique, des études GWAS ont identifié chez l'homme des loci, associés à l'adiposité, à l'IMC, au tour de taille et aux cas de l'obésité sévère (Fall and Ingelsson, 2014). Actuellement, 221 gènes ont été identifiés comme étant associés au phénotype de l'obésité (Yazdi et al., 2015). Dans la plupart des cas, ces polymorphismes ciblant un seul nucléotide (SNP, single-nucleotide polymorphism) se trouvent dans des gènes dont la fonction reste à ce jour inconnue (Fall and

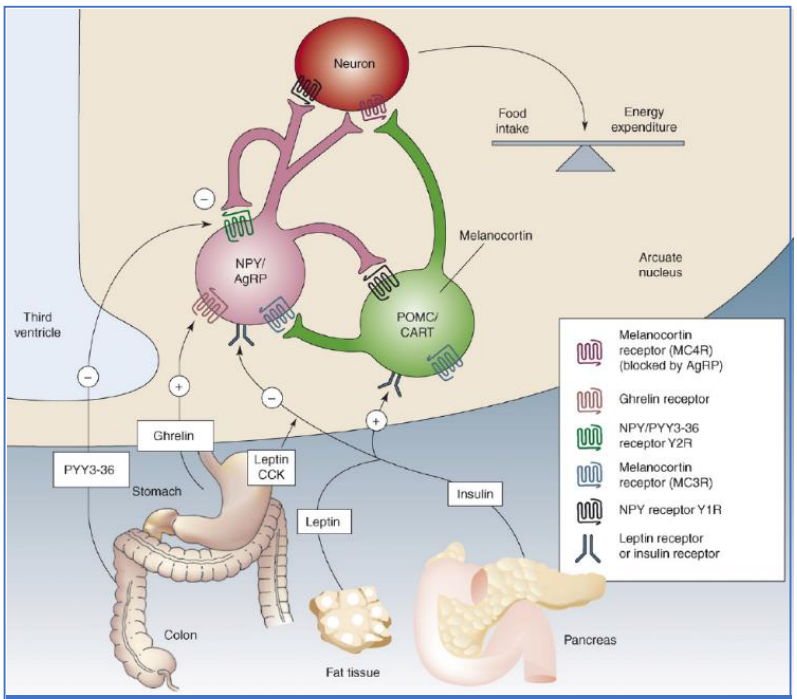


Figure 4. Régulation de l'homéostasie énergétique par les facteurs périphériques dans l'hypothalamus

Les facteurs sécrétés par le système digestif, le tissu adipeux et le pancréas agissent sur les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus. Des neurones NPY/AgRP ont une action orexigène, tandis que les neurones POMC/CART ont une action anorexigène. Ces neurones expriment des récepteurs à la leptine, l'insuline et la ghréline. Des projections vers les neurones de 2ème ordre dans les autres noyaux de l'hypothalamus ou dans les autres zones du cerveau permettent de réguler l'équilibre entre la prise alimentaire et les dépenses énergétiques.

Adapté de Stocker et al., 2008

Ingelsson, 2014; Yazdi et al., 2015). Ainsi, une prédisposition génétique pourrait contribuer au développement de l'obésité.

Cependant, **l'ensemble de ces facteurs, qu'ils soient génétiques ou liés au mode de vie, ne suffisent pas à expliquer l'explosion de l'épidémie d'obésité actuelle**, notamment l'apparition d'une obésité de plus en plus précoce chez les enfants. Des pathologies métaboliques des parents pourraient prédisposer leurs enfants à développer une obésité plus tard dans la vie. Ce concept de **"conditionnement"** par un environnement pendant le développement précoce, **"Origines Développementales de la Santé et des Maladies"** (DOHaD pour *Developmental Origins of Health and Disease*), sera exposé dans la partie 2) de ce chapitre, ainsi que ses mécanismes moléculaires sous-jacents. Les processus épigénétiques pourraient contribuer à cette l'épidémie, comme nous le verrons par la suite dans les chapitres II et III (Gabory et al., 2011; Stöger, 2008).

1-4-2) Physiopathologie de l'obésité

L'obésité correspond, d'une façon générale, à un déséquilibre entre l'apport calorique et les dépenses énergétiques, qui regroupent le métabolisme de base, nécessaire au fonctionnement de l'organisme, la thermogénèse et l'activité physique. **Le système nerveux central (SNC), contrôle la prise alimentaire et les dépenses énergétiques** (Figure 4). Dans le noyau arqué de l'hypothalamus se trouvent différentes populations des neurones : neurones exprimant soit le neuropeptide Y (NPY) et la protéine agouti (AGRP, agouti-related protein), qui augmentent l'appétit, soit la proopiomélanocortine (POMC, proopiomelanocortin), qui a une action contraire, via un réseau neuronal complexe (Stocker and Cawthorne, 2008). Les signaux périphériques, produits après le repas, ou au contraire en période de jeûne, agissent sur leurs récepteurs spécifiques situés sur ces neurones, régulant ainsi la balance énergétique. Par exemple, la leptine est un important régulateur de la balance énergétique au niveau du noyau arqué, où elle inhibe l'appétit et active la dépense énergétique (Schwartz et al., 2000). La **leptine** est produite par le TAB proportionnellement à la quantité de la masse adipeuse. En cas d'obésité chronique, la sécrétion de la leptine par le TAB est augmentée, mais une résistance à la leptine se développe progressivement au niveau du SNC (Considine et al., 1996; Sahu, 2003). Une absence de signal de la leptine est à l'origine de l'hyperphagie accrue et du déséquilibre énergétique chez un sujet obèse. Des mutations dans le gène de la leptine sont responsables d'une obésité monogénique sévère. Par ailleurs, d'après au moins 11 études, ce gène est associé au phénotype d'obésité (Rankinen et al., 2006; Yazdi et al., 2015).

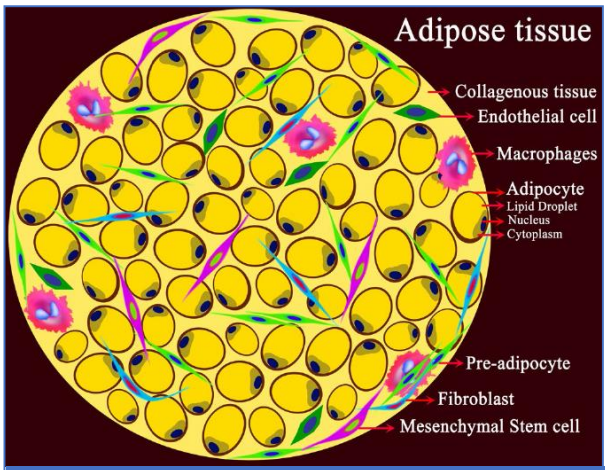


Figure 5. Composition cellulaire du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc (TAB) contient du tissu conjonctif avec du collagène, où se trouvent différents types cellulaires: les adipocytes, cellules du stockage des lipides, les préadipocytes, leurs prédécesseurs, des macrophages spécifiques du TAB, des fibroblastes, des cellules endothéliales et les cellules souches mésenchymateuses. L'adipocyte contient une gouttelette lipidique (en jeune), le noyau (en bleu) et le cytoplasme (en gris).

Adapté de Rezaee 2013

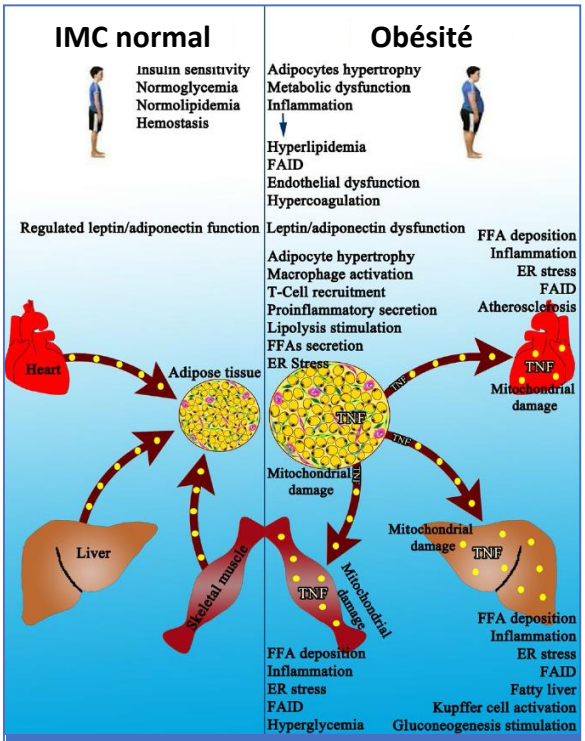


Figure 6. Fonction altérée du tissu adipeux blanc (TAB) en cas d'obésité

(A) En état physiologique normal, les adipocytes du TAB stockent les lipides provenant des tissus périphériques.

(B) En cas d'obésité, les adipocytes sont hypertrophiés et le métabolisme lipidique est perturbé dans le TAB. Des facteurs proinflammatoires, produits par les macrophages activés du TAB, et des acides gras (AG) libres sont secrétés dans la circulation systémique. Les AG s'accumulent ainsi dans le cœur, le foie et les muscles. L'état inflammatoire, le stress du réticulum endoplasmique, l'insulino-résistance et le dysfonctionnement mitochondriale sont alors induits dans ces organes.

FFA – free fatty acid, ER – réticulum endoplasmique, TNFα – tumor necrosis factor-α, FAID – fatty acid-induced insulin pathway disturbance.

Adapté de Rezaee 2013

Une augmentation de l'apport calorique et une diminution de la dépense énergétique entrainent une **expansion de la masse grasse**, principalement stockée dans le TAB. Plusieurs types cellulaires constituent ce tissu : adipocytes, préadipocytes, macrophages spécifiques du TAB, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules souches mésenchymateuses (Figure 5) (Rezaee, 2013). Le TAB est en majorité composé d'adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des lipides. L'augmentation de la masse adipeuse se manifeste par leur hypertrophie, augmentation en taille, et/ou par leur hyperplasie, augmentation en nombre, suite à une différenciation des préadipocytes.

En cas d'excès énergétique continu, **le métabolisme lipidique** est perturbé dans le TAB : la lipolyse est augmentée, alors que la capacité de β-oxydation est réduite, et les acides gras (AG) libres sont donc sécrétés dans la circulation sanguine (Figure 6). Ce flux permanent d'AG provoque une altération du profil lipidique systémique et, par conséquent, une accumulation des lipides dans les tissus périphériques, tels que le foie, le cœur et les muscles (Rezaee, 2013). De plus, les macrophages du TAB induisent un état inflammatoire, en sécrétant de cytokines pro-inflammatoires., Ces perturbations métaboliques du TAB s'accompagnent généralement d'un stress du réticulum endoplasmique, de l'altération du fonctionnement des mitochondries et d'une insulino-résistance au niveau périphérique, participant ainsi au développement des comorbidités associées à l'obésité.

En plus de la leptine, le TAB sécrète d'autres **adipokines**, comme l'adiponectine : celle-ci joue un rôle anti-inflammatoire et a une capacité d'amélioration de la sensibilité à l'insuline et amélioration de l'athérosclérose (Haluzík et al., 2004; Rankinen et al., 2006; Whitehead et al., 2006). Contrairement à la leptine, son taux est diminué en cas d'obésité, ce qui contribuerait au développement de l'insulino-résistance.

Pour conclure, le TAB, tissu de stockage des réserves de l'organisme, produit des cytokines inflammatoires, importants dans la régulation de la balance énergétique au niveau du SNC et de la sensibilité à l'insuline ; il sécrète aussi les AG libres, alors stockés par les tissus périphériques. **Un dialogue altéré entre le TAB, le foie, le muscle, le cœur et le SNC conduit au déséquilibre métabolique lié à l'obésité.**

2) L'obésité maternelle dans le cadre du concept des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD)

2-1) Définition de la DOHaD et premières preuves de concept

L'hypothèse, relativement récente, des **origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte** s'est développée à partir de la notion de programmation fœtale, initialement proposée par Barker dans les années 80 (Barker, 1990; Barker et al., 1989). Ce concept postule que l'environnement dans lequel se trouve l'individu au cours de sa période de développement précoce (périodes préconceptionnelle, *in utero* et post-natale précoce), peut avoir des conséquences importantes pour sa santé au cours de sa vie adulte, conduisant au développement de maladies chroniques (obésité, diabète, pathologies cardio-vasculaires, cancer et affections respiratoires chroniques). Le terme de **"conditionnement développemental"** a été récemment proposé pour ce concept (Hanson and Gluckman, 2014).

Selon une des premières études épidémiologiques dans le domaine, publiée par Forsdahl dans les années 1970 en Norvège, des conditions de vie précaires au cours de l'enfance et de l'adolescence, suivies par une surabondance alimentaire à l'âge adulte, contribueraient au développement des maladies cardio-vasculaires (Forsdahl, 1977). La mortalité infantile, un indicateur de niveau de vie selon les auteurs, est corrélée avec la mortalité des Norvégiens âgés de 40 à 69 ans dans la même période étudiée (1896-1925). Des modèles chez les rongeurs ont également permis de proposer **un lien entre restriction nutritionnelle périnatale et conséquences à long terme** sur la descendance. Plus particulièrement, le poids corporel, la fonction rénale, l'activité locomotrice, le comportement émotionnel et l'apprentissage sont affectés par la nutrition maternelle (Roeder and Chow, 1972).

Les travaux sur des cohortes britanniques réalisés par Barker et collègues, dans les années 1980, ont mis en évidence une corrélation entre le poids de naissance, la pression artérielle à l'âge adulte et la mortalité due à la maladie cardiovasculaire. Ainsi, **le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est associé à une plus grande susceptibilité de développer des maladies chroniques du système cardiovasculaire à l'âge adulte** (Barker et al., 1989; Barker et al., 2010).

Les études, basées sur les cohortes d'enfants de femmes qui ont subi, pendant leur grossesse, une famine sévère durant l'occupation allemande de l'hiver 1944-45 en Hollande (*Dutch Hunger Winter*), ont apporté des preuves pour le concept de la DOHaD dès 1976 (Ravelli et al., 1976; Ravelli et al., 1999). La consommation alimentaire de ces femmes enceintes a été limitée à 400–800 calories par jour. Il a été démontré que leurs enfants, conçus ou nés pendant la famine, étaient prédisposés aux pathologies métaboliques, cardiovasculaires et psychiatriques à l'âge adulte (Schulz, 2010; Taylor and Poston, 2007). La nutrition maternelle est ainsi un facteur contributif de la DOHaD.

Depuis, plusieurs études ont démontré que l'environnement *in utero* conduit à des altérations permanentes de la structure des organes, et par conséquent dans leur fonction (Li et al., 2011; Taylor and Poston, 2007). **La sous-nutrition, tout comme la surnutrition et l'obésité de la mère, pendant des fenêtres cruciales de développement, prédisposerait la progéniture au syndrome métabolique lorsqu'elle atteint l'âge adulte.**

Pour la suite de cette introduction, j'ai choisi de me limiter aux effets de l'obésité et de la surnutrition maternelle sur la descendance.

2-2) Preuves du conditionnement développemental induit par l'obésité maternelle chez l'homme

2-2-1) Prévalence de l'obésité chez les femmes

La prévalence de femmes en surpoids ou obèses dans le monde a atteint 38% en 2013 (Ng, 2014). Le taux de l'obésité féminine varie considérablement selon les pays, dépendant de son niveau de développement économique et des coutumes en termes de nutrition. Ce taux présente des chiffres alarmants dans certains pays du Moyen-Orient (65%), de l'Afrique du Nord et de l'Amérique centrale (Ng, 2014). A titre d'exemple, aux Etats-Unis la prévalence de l'obésité et du surpoids dans la population féminine est de 62,6% en 2013 (Ng, 2014). Par ailleurs, la proportion d'obésité parmi les femmes enceintes est estimée entre 18,5 et 38,3%, (Lee and Koren, 2010).

D'après l'enquête ObEpi, la proportion de femmes en surpoids en France est de 26,3% en 2012 (ObEpi-Roche, 2012). En 2012, 6% des jeunes Françaises de 18-24 ans sont obèses. Cette proportion augmente avec l'âge : **11,1% des femmes âgées de 25 à 34 ans sont obèses**,

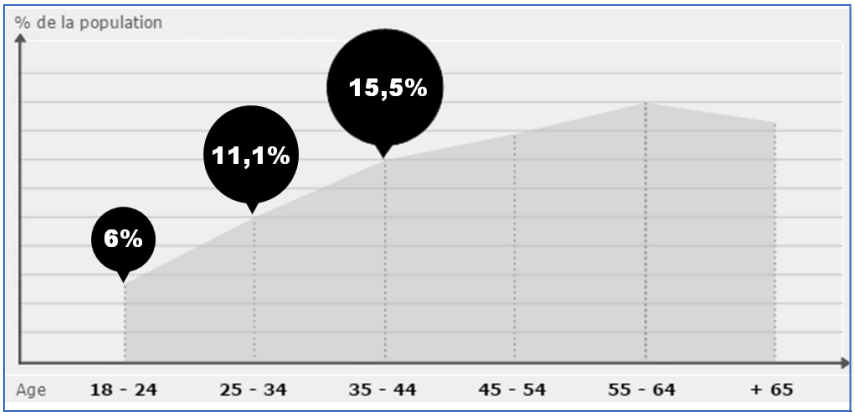


Figure 7. Prévalence de l'obésité (IMC ≥ 30 kg/m2) chez la femme adulte en fonction de l'âge en France

Age 18 - 24 25 - 34 35 - 44 45 - 54 55 - 64 + 65

Parmi les femmes en âge de procréer, la prévalence est de 6% (18-24 ans), de 11,1% (25-34 ans) et de 15,5% (35-44 ans) selon l'âge.

IMC – indice de masse corporelle.

ObEpi (Roche) 2012

et ce chiffre atteint 15,5% pour les femmes de 35 à 44 ans (Figure 7). Seulement 58% des françaises ont ainsi un IMC compris entre 18,5 et 25 kg/m².

Ces enquêtes attestent qu'au niveau mondial de plus en plus de femmes en âge de procréer sont en état de surcharge pondérale.

2-2-2) Complications pour la mère obèse et son enfant

La proportion de femmes obèses ne cesse d'augmenter, alors que l'obésité entraine des risques pour la mère et l'enfant pendant et après la grossesse. Chez la mère tout d'abord, l'obésité est liée à **l'infertilité** : les femmes ayant un IMC ≥ à 29 kg/m^2 ont plus de difficultés à concevoir un enfant que des femmes avec une corpulence normale (Haute Autorité de Santé, 2011). **L'obésité pendant la grossesse est associée à de nombreux risques** pour la santé : hypertension artérielle, pré-éclampsie, diabète gestationnel, infections urinaires, risque d'accouchement par césarienne et complications thromboemboliques après l'accouchement (Haute Autorité de Santé, 2011; Lee and Koren, 2010). Ces risques ne se limitent pas à la grossesse puisque les femmes ont 7 fois plus de risque de développer un diabète de type 2 après un diabète gestationnel (Bellamy et al., 2009).

L'obésité chez la femme enceinte augmente le taux d'enfants mort-nés et la **mortalité périnatale**, ainsi que les risques de **macrosomie** (poids à la naissance > à 4 kg ou au 90ème percentile pour une population donnée) ou de **RCIU** (une croissance fœtale < au 10ème percentile pour une population de même âge gestationnel), de naissance prématurée et d'hyperglycémie chez le bébé (Gaudet et al., 2014; Haute Autorité de Santé, 2011; Lepercq et al., 2000). Par ailleurs, l'obésité maternelle accroit les **risques obstétricaux**, ainsi que les risques de **malformations congénitales**. Parmi les anomalies de structure ou de fonction des organes, les plus fréquentes sont l'hydrocéphalie, les anomalies cardio-vasculaires, les défauts de fermeture du tube neural ou encore de la fente labio-palatine (Lee and Koren, 2010).

2-2-3) Conditionnement du phénotype de l'individu par l'obésité maternelle

Les femmes obèses sont susceptibles de transmettre à leurs enfants le risque de développer une obésité et ses comorbidités associées. Ainsi, les fœtus des femmes obèses présentent une **adiposité augmentée**, et de façon concordante un niveau élevé de leptine dans

le sang de cordon ombilical. L'insulino-résistance, observée chez le fœtus, est corrélée avec l'IMC préconceptionnel de la mère (Catalano et al., 2009a).

Les altérations provoquées par l'obésité *in utero*, sembleraient persister au cours de la vie post-natale. La macrosomie de l'enfant à la naissance, souvent observée chez les femmes obèses, est associée à un risque élevé d'obésité, ainsi qu'à d'autres maladies chroniques, telles que le diabète et les maladies cardio-vasculaires chez le jeune adulte (Poston, 2012).

L'IMC maternel déterminerait le poids de l'enfant (Poston, 2012). Une association entre obésité maternelle et obésité dans l'enfance a été étudiée dans une cohorte d'environ 8500 enfants de 2 à 4 ans, nés dans des familles à faible revenu (Whitaker, 2004). La proportion d'obésité infantile est de 28,8% pour les patientes avec une obésité morbide, par rapport à 9% pour les femmes ayant l'IMC normal. Le risque de développer une obésité infantile est donc élevé chez les descendants de femmes obèses, et progresse selon la sévérité de l'obésité. Une étude américaine, menée sur une cohorte "Growing Up Today Study" d'environ 12000 enfants, montre, pour la première fois, une association entre le gain de poids gestationnel maternel et l'adiposité à l'âge de 9 à 12 ans. Les enfants de femmes ayant pris un poids excessif au cours de la grossesse ont un risque plus élevé de développer une obésité. La proportion des enfants obèses chez les femmes avec un IMC préconceptionnel ≥ 30 kg/m^2 est de 24,6%, tandis qu'elle est seulement de 1,9% chez les femmes à IMC normal (Oken et al., 2008). D'après une étude sur une cohorte anglaise de 1958, l'IMC des enfants (7, 11, 16 et 23 ans) suit l'augmentation de l'IMC des parents (Lake et al., 1997). Le risque de développer une obésité à l'âge adulte (33 ans) est élevé si un des parents est obèse (*Odds ratio* = 3,43 pour les fils et 2,98 pour les filles). En cas d'obésité présente chez les deux parents, ce risque augmente de manière considérable : 8,42 pour les fils et 6,75 pour les filles.

Dans une autre cohorte, l'obésité maternelle est associée aux risques de maladie cardiovasculaire et de phénotype métabolique néfaste à l'âge adulte. Les descendants de mères obèses ont un IMC, un tour de taille, une pression artérielle systolique ainsi que des niveaux d'insuline et de triglycérides plus élevés que les descendants de mères non-obèses (Hochner et al., 2012).

D'après l'ensemble des études discutées ci-dessus, **l'obésité chez la femme est associée à un risque accru de complications pour elle-même, mais également pour son enfant** : altérations du poids, de l'adiposité et de l'insulinorésistance à la naissance, pendant l'enfance,

l'adolescence et à l'âge adulte. **Le risque de développer le syndrome métabolique est donc fortement augmenté chez la descendance des femmes obèses**.

Les études de cohortes de femmes obèses peuvent apporter beaucoup d'informations sur le conditionnement précoce du phénotype de la descendance. Cependant, elles nécessitent toutefois beaucoup de temps lorsqu'il s'agit d'études sur la descendance à long terme, sur plusieurs générations, par exemple. En outre, les études épidémiologiques peuvent être biaisées par l'influence de variables difficilement contrôlables telles que l'environnement socio-culturel ou la génétique des individus. En effet, le **mode de vie de la famille** où les parents sont en surpoids ou obèses (pratique des activités sportives, habitudes et traditions alimentaires, comportement maternel envers la nourriture…) joue un rôle important dans l'installation de l'obésité chez l'enfant (Thompson, 2013). **L'utilisation des modèles animaux permet de limiter l'impact d'autres facteurs environnementaux et génétiques confondants** et de contrôler les conditions d'exposition des fœtus à l'environnement maternel. Ces modèles sont des atouts pour comprendre les mécanismes à l'origine du conditionnement précoce de maladies. Les modèles les plus exploités sont les moutons, les primates et les rongeurs. Je vais porter mon attention sur les preuves obtenues sur les modèles de rongeurs.

2-3) Modèles rongeurs de surnutrition / obésité maternelle dans le contexte de la DOHaD

Bien qu'il existe, chez les rongeurs, des lignées avec une obésité monogénique, provoquée par des mutations génétiques, ou avec une obésité polygénique (Yazdi et al., 2015), je vais restreindre cette introduction aux modèles d'obésité induite exclusivement par la surnutrition. Actuellement, il existe dans la littérature scientifique un nombre considérable d'études qui s'intéressent aux influences de l'obésité ou du régime hyperlipidique chez la mère sur la santé de la descendance (Li et al., 2011; Williams et al., 2014). Les mécanismes du conditionnement développemental par l'obésité maternelle commencent à dévoiler leurs secrets.

Afin de rendre des femelles obèses, **différents régimes** sont utilisés : régime hyperlipidique (HFD, pour *high fat diet*), régime hyperglucidique (HS, pour *high sugar*) et régime dit "cafétéria" (Western diet) (Li et al., 2011). Ce dernier mime un régime alimentaire à base de viande rouge ou transformée, de fritures, d'aliments sucrés, de produits laitiers riches en lipides ou encore de graines raffinées. Une revue récente récapitule l'ensemble des travaux

Animal	Duration of maternal HFD	Composition	Effect (offspring)	Organ affected (offspring)
Mouse	2 weeks prior to mating, during G and L	36% of calories from fat	Decreased fetal growth and birth weight, increased expression of hepatic lipogenic genes	Liver
	4, 12 or 23 weeks prior to mating	60% of calories from fat	No effect on hepatic inflammation or expression of genes involved in lipid metabolism	–
	8 weeks prior to mating, during G and L	32% of calories from fat	Increased fetal weight and placental GLUT1 and SNAT2 mRNA	Placenta
	8 weeks prior to mating, during G	60% of calories from fat	Type 2 diabetes in F1 and F2, higher β-cell mass in F1, lower β-cell mass in F2	Pancreas
	During P and L until 3 months	49% of calories from fat	Insulin resistance, increased hepatic triglycerides, hepatic steatosis	Liver
	1 week prior to mating, during G and L	35% of calories from fat	Metabolic syndrome, hepatic lipid accumulation, increased hepatic JNK phosphorylation	Liver
	4 weeks prior to conception during G and L	45% of calories from fat	Reduced mitochondrial function, increased hepatic lipogenesis, oxidative stress, changes the expression of inflammatory genes	Liver
	During G, L, G and L	49% of calories from fat	Insulin resistance, increased expression of hepatic lipogenic genes	Liver
	6 weeks prior to mating, during G and L	53% of calories from fat	Increased birth weight, increased protein levels in fatty acid oxidation, altered hepatic microRNA	Liver
	6 weeks prior to mating, during G and L	18% fat (w/w)	Hypertension, hepatic steatosis	Liver
	During G and L	18% fat (w/w)	Effects on bone quantity and quality	Bone
	3 weeks prior to mating, during G and L	60% of calories from fat	Increased anxiety behavior, molecular changes in the hippocampus	Brain
	During G and L	20% fat (PUFA or SFA)	SFA increased total plasma cholesterol and low density lipoprotein cholesterol	–
	During G and L	20% w/w (PUFA or SFA)	Reduced hepatic and heart DHA content	Liver, Heart
	4 weeks prior to mating	62% of calories from fat	Increased blood pressure and body weight, altered histone modification of ADIPOQ promoter	Adipose
	12 weeks prior to mating, during G and L	60% of calories from fat	Decrease in global methylation in brain	Brain
	During G	45% of calories from fat	Increased birth weight and glucose level, altered histone modification of PCK1 gene	Liver
	2 weeks prior to mating, during G and L	21% fat (w/w)	Altered vascular function and CpG methylation of FADS2 promoter	Liver, aorta
	4 weeks prior to mating, during G and L	45% of calories from fat	Reduced insulin sensitivity, altered growth hormone GH axis, increased body length, altered expression of paternally imprinted genes in F3	Liver, Brain
Rat	During G and L	40% of calories from fat	No difference in birth weight	–
	From postnatal day 24, during G and L	60% of calories from fat	Increased body weight, glucose and insulin levels, and insulin secretion	Pancreas
	From pregnancy to postnatal day 10	21% fat (w/w)	Increased serum insulin and leptin, increased blood pressure and left ventricular wall thickness	Left ventricle
	4 weeks prior to mating, during G and L	60% of calories from fat	Increased adiposity and serum leptin	–
	10 days prior to mating, during G and L	33% fat (w/w)	Reduced serum DHA	–
	15 days prior to mating, during G and L	40% (w/w)	Decreased hepatic mtDNA copy number and PGC1α mRNA expression	Liver
	6 weeks prior to mating, during G	35% of calories from fat	Increased serum leptin, body weight and alterations in food motivated behavior	–
	10 days prior to mating, during G and L	26% of calories from fat	Increased blood pressure, altered aortic structure and renal function, insulin resistance, lower heart rate, endothelial dysfunction, and altered vascular fatty acid content	Aorta
	6 weeks prior to mating until the end of weaning	40% of calories from fat	Increased body weight, serum leptin and insulin, and reduced hypothalamic leptin-dependent STAT3 phosphorylation	Brain
	11 weeks prior to mating (from postnatal 23), G	60% of calories from fat	Increased serum leptin and insulin, and expression of hypothalamic appetite-regulating genes	Brain
	Started embryonic day 6	50% of calories from fat	Precocious puberty, increased proliferation of neuroepithelial and neuronal precursor cells	Brain
	8 weeks prior to mating, during G and L	29% of calories from fat	Increased body weight, blood glucose and leptin, reduced phospho-STAT3 and SOCS3 expression in the arcuate nucleus	Brain
	From gestational day 2	60% of calories from fat	Increased body weight and serum leptin, and reduced phosphorylation of STAT3 in the arcuate nucleus	Brain
	Defined periods of G and L	40% of calories from fat	Increased serum glucose and reduced pancreatic glucokinase mRNA	Pancreas
	During G, L or G and L	40% of calories from fat	Increased serum glucose, increased serum leptin, and pancreatic β-cell hyperplasia and hypertrophy	Pancreas
	During the different period of G	40% of calories from fat	Hyperglycemic, impaired insulin release, changesβ-cell volume and number, reduced PDX-1 and GK expression in β-cells	Pancreas
	2 weeks prior to mating, during G and L	18% fat (w/w)	Reduced birth weight and weight gain on unsaturated fatty acids diet, and fewer large islets on saturated fatty acids diet	Pancreas
	4 weeks prior to mating, during G	59% of calories from fat	Increased serum insulin and altered expression of insulin signaling proteins in skeletal muscle	Skeletal muscle

Tableau 1. Effet du régime hyperlipidique (HFD) chez la mère sur le phénotype des descendants chez les rongeurs

G – gestation, L – lactation.

Adapté de Williams et al., 2014

sur les effets du régime HFD, indépendamment de l'obésité maternelle, chez les modèles animaux : les rongeurs, les moutons et les primates (Williams et al., 2014). Dans le Tableau 1, les effets sur le phénotype de la descendance chez les rongeurs sont représentés. Les effets du régime HFD et/ou l'obésité chez les primates seront développés plus tard dans l'introduction.

Chez la souris, le régime HFD maternel a des effets sur la descendance à court terme. Tout d'abord, **le poids fœtal est affecté par l'obésité maternelle** (Tableau 1). De manière intéressante, différents effets du régime HFD sont observés chez la souris : une restriction de croissance fœtale ou, au contraire, le poids fœtal plus important, selon la lignée de la souris et la composition du régime utilisés (Hartil et al., 2009; Jones et al., 2009; Strakovsky et al., 2011; Williams et al., 2014). L'expression génique et la fonction placentaire sont aussi largement affectées par l'obésité maternelle (Gabory et al., 2012; Jones et al., 2009; King et al., 2013b; Mao et al., 2010; Sasson et al., 2015). Les effets de l'obésité maternelle sur le placenta et son rôle dans le concept de la DOHaD seront explicités dans le chapitre III de l'introduction, ainsi que dans une revue publiée par notre équipe (Tarrade et al., 2015).

Quant aux **effets à long terme**, le régime HFD chez la mère conditionne plusieurs paramètres liés au syndrome métabolique chez la descendance. Par exemple, la descendance adulte de femelles obèses développe une **adiposité accrue** avec une hypertrophie des adipocytes, associée à une hyperphagie. Les effets à long terme sur le poids corporel et l'adiposité, ainsi que sur le poids du foie, sont plus prononcés chez les descendants mâles. Le **métabolisme glucidique** est également altéré, car une insulinorésistance et une intolérance au glucose sont observées chez ces animaux. De plus, **l'activité locomotrice** et la masse musculaire sont diminuées. Ces défauts de développement du muscle squelettique, qui est, avec le foie, un site majeur de stockage de glucose, contribueraient à une **insulinorésistance** (Alfaradhi and Ozanne, 2011). De plus, l'obésité maternelle prédispose la descendance à une hypertension (Samuelsson et al., 2008) (Tableau 1).

L'effet à long terme du régime HFD chez la mère sur des paramètres du syndrome métabolique est confirmé par de nombreuses études ultérieures (Williams et al., 2014) (Tableau 1). Le développement de la **stéatose hépatique**, qui est une accumulation des lipides dans le foie, chez la descendance exposée à l'obésité ou au régime HFD maternels, a été observé dans de nombreux travaux chez la souris (Ashino et al., 2012; Bruce et al., 2009; Oben et al., 2010; Samuelsson et al., 2008). Ce sujet sera exposé plus en détails dans le chapitre III de l'introduction.

Le **profil lipidique** des descendants pourrait être également conditionné à long terme par l'obésité maternelle. Par exemple, le niveau de cholestérol est plus élevé chez les descendants adultes des mères nourries avec le régime HFD (Elahi et al., 2009). De manière intéressante, cet effet à long terme est plus prononcé chez les mâles que chez les femelles.

L'alimentation maternelle aurait également un impact sur le **comportement alimentaire** de la descendance à l'âge adulte. Les souriceaux de mères nourries avec un HFD, au cours de la gestation et de la lactation, ont une préférence accrue pour le saccharose et le gras. Ce phénomène est accompagné par une expression altérée des gènes dans le système méso-cortico-lymbique, le circuit de la récompense, et dans l'hypothalamus (Vucetic et al., 2010) (Tableau 1).

Dans une autre étude les différents régimes HFD, avec des lipides provenant soit du lard (45 ou 60% de kcal), soit du beurre (32 ou 60l% kcal), ont été appliqués pendant 4 semaines avant la conception, et pendant toute la gestation et la lactation (Platt et al., 2014). Étonnamment, cette étude rapporte une **absence des effets du régime HFD chez la souris sur le phénotype de la descendance adulte**. L'environnement obésogène pendant la vie adulte servirait de "révélateur" d'un conditionnement inadéquat du phénotype par l'obésité maternelle (Alfaradhi and Ozanne, 2011; Pruis et al., 2014). Dans ce modèle un challenge avec un régime HFD après le sevrage permettrait peut-être de révéler un phénotype obèse chez la descendance.

De plus en plus de données attestent de l'influence de **l'environnement nutritionnel paternel** sur le phénotype de la descendance (Grandjean et al., 2013; Lane et al., 2014). Chez la souris, les fœtus de pères obèses présentent une restriction de croissance fœtale et placentaire, ainsi qu'un retard du développement (Binder et al., 2012). Concernant les effets à long terme, l'obésité paternelle provoque une intolérance au glucose chez les descendantes femelles uniquement (Ng et al., 2010). Le transcriptome pancréatique est affecté (642 gènes sont dérégulés), mènant à une dysfonction des cellules β, productrices de l'insuline. En effet, la sécrétion de l'insuline est diminuée par rapport aux descendantes des pères minces. Quant aux mécanismes de ce phénomène, cette transmission passerait par des marques épigénétiques et des ARN apportés par le spermatozoïde au moment de la fécondation (revue Junien et al., 2015, Annexes). Par la suite, je vais restreindre cette introduction sur les effets maternels.

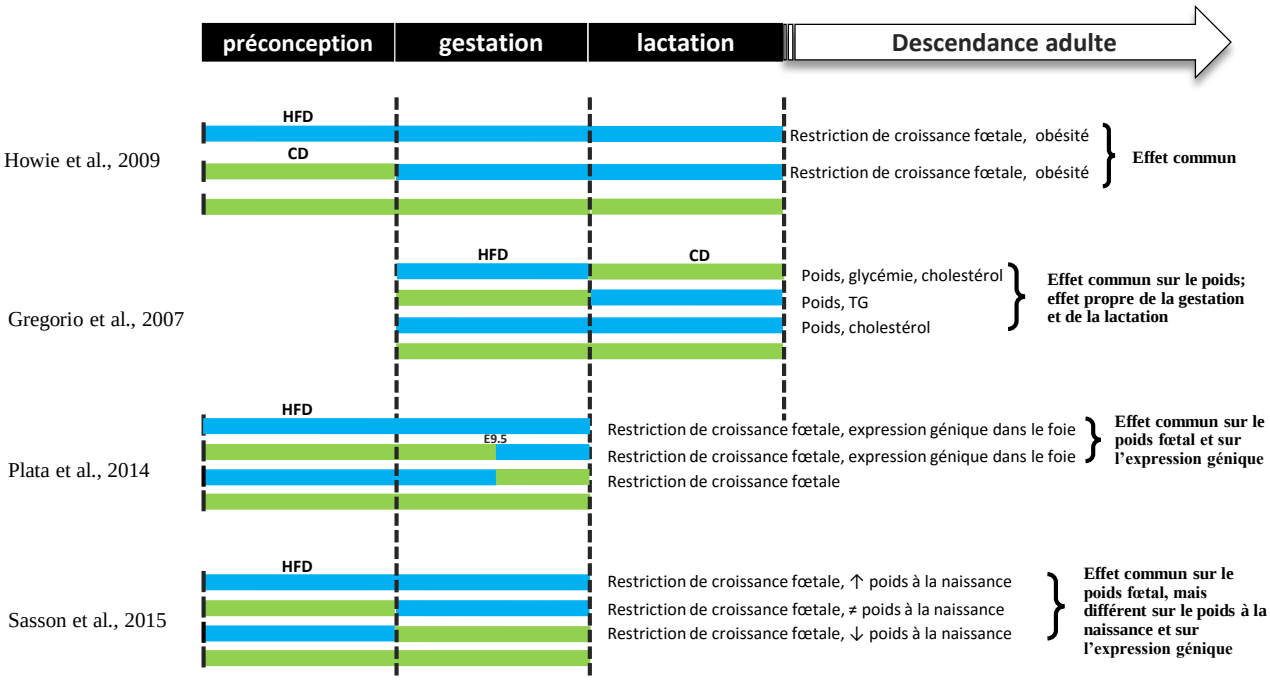


Figure 8. Fenêtres critiques d'influence de l'obésité maternelle sur la descendance

Effets de l'exposition à un régime hyperlipidique au cours de différentes périodes du développement
CD – régime contrôle (control diet, en vert), HFD – régime hyperlipidique (high-fat diet, en bleu).

2-3-1) Fenêtres critiques d'influence de l'obésité maternelle sur la descendance

La durée et la **période d'application du régime** sont importantes dans la révélation de ces effets à long terme chez la descendance. Chez la souris, différentes périodes d'exposition au HFD ont été testées : pendant la **gestation**, pendant la **lactation** ou **au cours de ces deux périodes** (Gregorio et al., 2010) (Figure 8). Le régime HFD, indépendamment de la période d'application, provoque une augmentation du poids chez les descendants, à partir de la 5ème semaine de vie. En revanche, des effets différents sont observés sur certains paramètres métaboliques des descendants. La tolérance au glucose est affectée uniquement dans le cas de l'exposition *in utero* (Tableau 1). Le taux de cholestérol sanguin est altéré quand le régime HFD est appliqué pendant la gestation ou à la fois pendant la gestation et la lactation. En revanche, la période de lactation est une fenêtre critique pour le conditionnement du taux de triglycérides.

D'après une autre étude, les fœtus des souris nourries avec le régime HFD, **2 semaines en amont de la conception et pendant la gestation**, ont un poids reduit au jour embryonnaire 18.5 (E18.5) (Figure 8). De plus, l'expression des gènes dans le foie fœtal au même stade est altérée par la nutrition maternelle. Le régime HFD donné seulement **pendant la 2ème moitié de la gestation** (à partir de E9.5) a les mêmes effets sur la croissance fœtale et l'expression génique, soulignant ainsi l'importance de cette période (Plata et al., 2014). Le changement du régime HFD à CD à E9.5 ne permet pas de restaurer le poids fœtal. Au contraire, l'inversion des effets délétères du HFD chronique sur l'expression génique est observée. Vu que la nutrition obésogène ne provoque pas l'obésité chez les mères dans cette étude, le régime HFD ainsi *per se* a un effet sur la descendance *in utero*.

Dans une récente étude sur un modèle de transfert d'embryon (au stade de 2 cellules) chez la souris, les effets du régime HFD, soit **uniquement en période préconceptionnelle** (10-12 semaines), soit **pendant la gestation**, soit **au cours de ces deux périodes**, ont été testés (Sasson et al., 2015) (Figure 8). Le régime HFD, indépendamment de la période d'exposition, provoque une diminution de la croissance fœtale à E12.5 et E17.5. Chez les fœtus mâles une diminution du poids placentaire est également observée, mais pas chez les femelles. De plus, l'efficacité placentaire est altérée par le HFD maternel chez les deux sexes. De manière intéressante, le poids à la naissance est altéré différemment selon la période d'exposition au HFD maternel : il est diminué dans le cas d'un HFD préconceptionnel, alors que le régime HFD chronique a un effet inverse. Le régime HFD appliqué uniquement au cours de la gestation ne modifie pas ce

paramètre. L'expression de quelques gènes dans le placenta à E12.5 est modifiée par l'obésité maternelle préconceptionnelle. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme lipidique et le développement tissulaire. En revanche, un nombre plus important de gènes impliqués dans l'inflammation et l'angiogenèse sont dérégulés par le HFD pendant la gestation ou par l'obésité chronique (Sasson et al., 2015).

Une **obésité chronique**, ainsi que le **HFD administré uniquement pendant la gestation**, prédisposent les descendants mâles et femelles à l'obésité à l'âge adulte. Le changement de régime de HFD à CD à la conception permet d'inverser cette prédisposition. Un résultat surprenant de cette étude est que seuls les descendants des mères nourries avec le HFD pendant la gestation présentent des signes d'altération du métabolisme glucidique (intolérance au glucose, hyperinsulinémie et le niveau des triglycérides (TG) hépatiques élevé) (Sasson et al., 2015). D'après ces résultats, le régime HFD au cours de la gestation conditionne l'adiposité et des paramètres métaboliques de la descendance, mais aussi l'expression génique dans le placenta.

Les fenêtres critiques d'exposition à un environnement délétère existent et se caractérisent par un impact plus important sur la descendance en termes de conditionnement à court et à long termes.

2-3-2) Effets respectifs sur le phénotype de la descendance du régime hyperlipidique et de l'obésité maternelle

Différentes composantes maternelles, telles que l'adiposité, la présence d'une insulino-résistance et d'une hyperglycémie, une dyslipidémie ou un diabète, ainsi que le régime *per se*, auraient des effets distincts sur la descendance. Il est **difficile de séparer les effets de l'obésité et du régime**, et des effets cumulatifs de plusieurs facteurs maternels sont observés dans la plupart des études (Williams et al., 2014).

Chez le rat, des femelles ont été nourries avec régime HFD *ad libitum* 4 semaines avant la conception, puis pendant toute la gestation et la lactation. Afin de distinguer les effets respectifs du régime HFD de ceux de l'adiposité, un groupe a subi une expérience de "*peer-feeding*" : sous régime HFD, elles ont été contraintes de consommer quotidiennement la même quantité calorique que les femelles sous régime contrôle. Ces femelles ne sont pas obèses. **L'obésité maternelle *per se* aurait un effet sur la descendance**, contrairement au régime HFD en l'absence d'obésité. Les descendants des mères obèses sont hyperphagiques, obèses et

insulino-résistants, tandis que ceux des mères non-obèses mais sous HFD, ont un phénotype similaire aux descendants des mères contrôles (White et al., 2009) (Tableau 1).

D'après une autre étude, le régime HFD au cours de la gestation et de la lactation n'a pas provoqué d'obésité chez les rates, contrairement au régime HFD donné 3 semaines avant la conception et pendant la gestation et la lactation (Figure 8). Cependant, le poids de la descendance à la naissance est diminué pour les deux groupes maternels, tandis qu'au sevrage le poids est plus élevé que celui de la descendance des mères contrôles. Le poids des descendants est vite rattrapé et dépassé, suggérant une croissance plus rapide pendant la période post-natale précoce chez les descendants des mères ayant reçu le HFD. Plus tard dans la vie, leur poids corporel est toujours plus élevé, ainsi que leur adiposité, de façon concordante avec l'augmentation du niveau de leptine. Une minéralisation osseuse augmentée est également observée chez ces animaux. D'après cette étude, **le régime HFD pendant la gestation et la lactation aurait un effet à long terme, indépendamment de l'obésité** (Howie et al., 2009).

Pour conclure, **les données obtenues sur les rongeurs semblent converger, chez la descendance exposée à une surnutrition et / ou à une obésité maternelle, vers un phénotype de syndrome métabolique**. La période et la durée de l'impact de l'environnement nutritionnel maternel auraient des effets à long terme différents, probablement à cause de mécanismes distincts. De manière intéressante, le conditionnement peut ne pas s'exprimer de la même façon selon le sexe du descendant (Junien et al., 2012). Le dimorphisme sexuel des réponses à l'environnement prénatal nécessite une exploration approfondie.

2-4) Mécanismes du conditionnement développemental par l'obésité maternelle

2-4-1) Altération des systèmes biologiques de la descendance par l'obésité maternelle.

Divers mécanismes du conditionnement développemental sont évoqués (Alfaradhi and Ozanne, 2011; Portha et al., 2014; Williams et al., 2014). Les revues de la littérature montrent que le conditionnement du syndrome métabolique induit par les facteurs environnementaux maternels passe par une altération de plusieurs systèmes biologiques chez la descendance :

- ✓ Au niveau du **système nerveux central**, une modification de la prise alimentaire et de la dépense énergétique et une altération de la régulation des systèmes de récompense ;

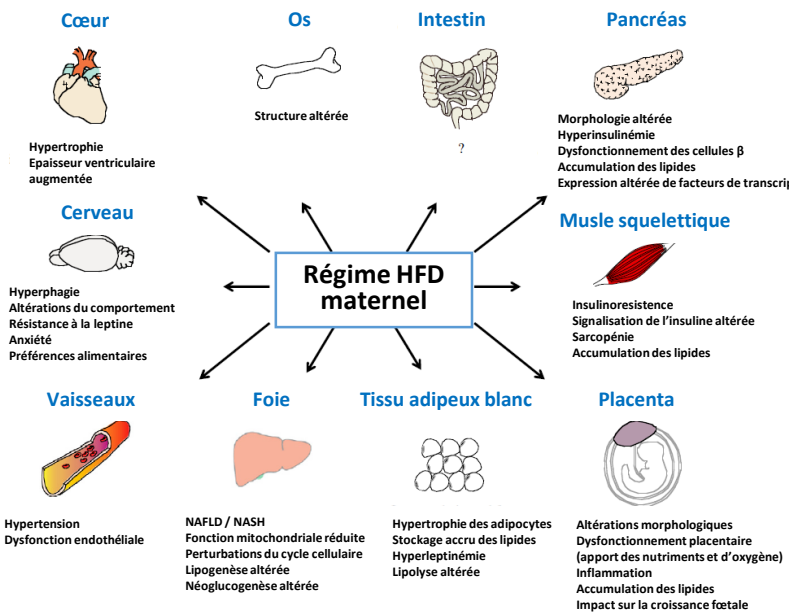


Figure 9. Effets de la nutrition hyperlipidique et/ou de l'obésité maternelle sur organogenèse

Des altérations structurelles et fonctionnelles dans nombreux organes sont observées dans le contexte de l'obésité / régime hyperlipidique chez la mère.

L'ensemble de ces altérations, interagissant avec l'environnement après la naissance, aboutissent à un syndrome métabolique à l'âge adulte.

NAFLD – stéatose hépatique non-alcoolique (non-alcoholic fatty liver disease), NASH – stéatohépatite non-alcoolique (non-alcoholic steatohepatitis).

Adapté de Williams et al., 2014

- ✓ Une dérégulation de l'**homéostasie glucidique** avec une résistance progressive des tissus périphériques à l'insuline, un épuisement des **cellules β du pancréas** et le développement d'une hyperglycémie ;
- ✓ Un dysfonctionnement du **muscle squelettique** en termes de résistance à l'insuline et de masse musculaire ;
- ✓ Une augmentation de la capacité de stockage des lipides dans les **TAB** ;
- ✓ Un développement d'une **stéatose hépatique** non-alcoolique ;
- ✓ Une altération du **système cardio-vasculaire**, résultant en une fréquence cardiaque et une pression artérielle élevées ;
- ✓ Un effet à long terme sur la minéralisation et la **masse osseuse**.

Les adaptations structurelles se mettent en place dans divers organes, lors de perturbations de l'environnement intra-utérin (Figure 9). Ces altérations peuvent avoir des conséquences à long terme sur la santé. Le **dysfonctionnement placentaire** serait également un facteur majeur dans le phénomène de conditionnement développemental. Ce sujet sera traité dans le chapitre III.

2-4-2) Les mécanismes épigénétiques dans le concept de la DOHaD.

Selon de nombreuses études, les mécanismes épigénétiques, qui régulent l'expression des gènes sans changer la séquence d'ADN, sont impliqués dans le conditionnement développemental. Les marques épigénétiques sont stables, héritables au cours des divisions cellulaires et sensibles à l'environnement (Gabory et al., 2011). **Les processus épigénétiques seraient une piste intéressante à explorer pour comprendre des mécanismes de "mémorisation" par le génome des événements environnementaux passés.** Des variations des apports nutritionnels et de la composition corporelle de la mère semblent affecter l'expression et l'activité enzymatique de la machinerie épigénétique. L'environnement pendant des périodes clés de la gamétogénèse et du développement pourrait ainsi perturber la **mise en place des marques épigénétiques**. Dans le cas où ces marques se situent au niveau des **gènes clés du développement et du métabolisme**, leur expression pourrait être modifiée et, par conséquent, l'organogenèse et le fonctionnement des organes. Cela contribuerait ainsi, plus tard, à un **phénotype sensible à un environnement délétère**, pouvant évoluer vers une pathologie (Li et al., 2011; Portha et al., 2014). Ce sujet sera explicité dans le chapitre II de cette introduction et dans une revue (Junien et al., 2015, Annexes).

IMC (kg/m^2) antérieur à la grossesse		Prise de poids recommandée (kg)
Institute of Medicine	**Société des obstétriciens et gynécologues du Canada**	***Institute of Medicine* et Société des obstétriciens et gynécologues du Canada**
< 19,8	< 18,5	12,5 à 18
19,8 à 26	18,5 à 24,9	11,5 à 16
26 à 29	25,0 à 29,9	7 à 11,5
> 29	≥ 30,0	7

Tableau 2. Prise de poids recommandée au cours de la grossesse, en fonction de l'IMC préconceptionnel

D'après l'Institute of Medicine (1990) et la Société des obstétriciens et gynécologues du Canada (2010).

IMC – indice de masse corporelle.

Adapté de Haute Autorité de Santé 2011

3) Perte de poids maternelle préconceptionnelle et effets sur la descendance

3-1) Recommandations aux femmes obèses avant d'entamer une grossesse

Compte tenu des nombreux risques que l'obésité fait courir à la mère et à l'enfant, un suivi est proposé aux femmes obèses dès le début de leur grossesse. L'*Institute Of Medicine* (IOM) a émis, en 1990, des **recommandations concernant la prise de poids au cours de la grossesse**, qui ont pour but de faire atteindre au nouveau-né un poids optimal, soit entre 3 et 4 kg. Basées sur des études épidémiologiques de gain de poids pendant la grossesse en fonction de l'IMC préconceptionnel, ces recommandations sont récapitulées dans le Tableau 2 (Lee and Koren, 2010).

Des changements de mode de vie peuvent avoir un effet, toutefois limité, sur la prise de poids excessive pendant la grossesse. En revanche, ils s'avèrent peu efficaces pour limiter la macrosomie chez l'enfant, ainsi que pour diminuer le risque de diabète gestationnel ou de pré-éclampsie chez la mère (Catalano and deMouzon, 2015). Par conséquent, **les femmes en surcharge pondérale sont incitées à perdre du poids avant la conception**, afin de normaliser la croissance fœtale et de diminuer les risques de complications obstétricales par une amélioration de l'environnement métabolique maternel.

La Haute Autorité de Santé française, qui a pour mission de définir des recommandations de santé publique, préconise ainsi (Haute Autorité de Santé, 2011) :

> ***"pour les femmes avec une obésité ayant un désir de grossesse il est recommandé d'encourager la perte de poids en informant sur les bénéfices pour sa fécondité, sa santé et celle de l'enfant à naître (mesures alimentaires et activité physique)"***

Il incombe aux professionnels de santé d'expliquer aux femmes, dont l'IMC est ≥ 30 kg/m^2, qu'une perte de poids de 5 à 10% se traduit par un effet bénéfique sur la fertilité, sur la santé de la femme elle-même et celle de son futur enfant. Des conseils doivent ainsi être prodigués aux femmes en surpoids ou obèses pour qu'elles perdent du poids avant la grossesse et atteignent un IMC inférieur à 30 kg/m^2 voire à 25, dans l'idéal (Haute Autorité de Santé, 2011). Cette assistance en amont de la grossesse est essentielle, car environ la moitié des grossesses ne sont pas planifiées et aux Etats-Unis, seulement 33 à 40% des femmes ont un poids gestationnel conforme aux recommandations de l'IOM (Lee and Koren, 2010).

Une alimentation saine et une activité physique régulière, constituent les deux principales stratégies pour maigrir grâce à un changement de mode de vie. Suivre un régime n'est toutefois pas recommandé aux femmes enceintes, car cela peut induire des carences nutritionnelles pour le fœtus (Haute Autorité de Santé, 2011). En cas d'obésité morbide, une intervention chirurgicale peut être prescrite. Cependant, **les conséquences positives ou délétères d'une perte de poids importante avant la grossesse sur la croissance du fœtus, mais surtout sur la santé à long terme des enfants, ne sont pas bien décrites dans la littérature.**

3-2) Effets de la perte de poids maternelle sur la santé des enfants

D'après des données récentes, les trajectoires pondérales en période périconceptionnelle peuvent jouer un rôle pendant les phases précoces du développement et avoir ainsi un impact sur la santé des enfants (Diouf et al., 2011; Rattanatray et al., 2010; Tuersunjiang et al., 2013; Wei et al., 2015; Weisman et al., 2011; Zambrano et al., 2010).

Chez les femmes en surpoids ou obèses au moment de conception, le poids des nouveau-nés s'avère plus élevé que celui des femmes avec un IMC préconceptionnel normal (Weisman et al., 2011) (Tableau I, Annexes). Ces résultats ont été obtenus dans une cohorte prospective de 116 femmes aux Etats-Unis, sur une période d'étude de 2 ans. Dans une autre cohorte, le suivi longitudinal des enfants a démontré qu'un IMC préconceptionnel maternel supérieur à 30 est un bon prédicteur du poids corporel et de l'adiposité à l'âge de 6-11 ans (Catalano et al., 2009b). De manière intéressante, **une perte de poids ou un faible gain de poids pendant la grossesse diminue le risque de macrosomie** (Bogaerts et al., 2015) (Tableau I, Annexes).

Les conséquences du changement du poids des mères avant la grossesse sur le poids à la naissance des enfants ont été étudiées dans une cohorte française, EDEN, concernant près de 1800 femmes. Les auteurs ont comparé le poids de ces femmes à 20 ans et juste avant la grossesse. Dans cette étude, **une perte de poids chez les femmes sans surpoids** (IMC < 25) **avant la grossesse est associée à un risque de petit poids des enfants à la naissance**. En revanche, chez les mères en surpoids ou obèses (IMC > 25) en début de grossesse, l'effet du changement de poids en période préconceptionnelle (perte / prise de poids) sur le poids à la naissance n'a pas été demontré (Diouf et al., 2011) (Tableau I, Annexes).

Des changements de poids entre deux grossesses peuvent influencer la croissance fœtale à la grossesse suivante. Une étude, effectuée sur une cohorte suédoise, rapporte que **le risque**

d'avoir un enfant grand pour l'âge gestationnel (LGA, large for gestational age) **est diminué chez les femmes, qui ont perdu au moins une unité d'IMC** avant la 2ème grossesse (Villamor and Cnattingius, 2006).

Dans les études mentionnées ci-dessus, **les mécanismes sous-jacents aux effets du poids maternel préconceptionnel sur la croissance fœtale ne sont pas connus**, car les causes exactes de cette perte de poids (changement d'alimentation, activité physique régulière, maladies) ne sont pas documentées. Par la suite, je ferai une revue des études qui se sont focalisées sur des interventions au niveau de l'alimentation, de l'activité physique ou chirurgicale chez les sujets obèses, chez l'homme ou dans des modèles animaux.

3-2-1) Perte de poids par chirurgie bariatrique chez les patientes atteintes d'obésité sévère

Le traitement le plus efficace contre l'obésité sévère (IMC > 35), quand les méthodes de changement de mode de vie n'ont pas d'effet, reste la chirurgie bariatrique. Ce type d'opération restreint la capacité gastrique et l'absorption intestinale des aliments, diminuant ainsi l'apport calorique. Bien que les patients restent en surpoids, cette intervention leur fait durablement perdre environ 30% de leur poids, ce qui permet de réduire significativement la morbidité et les risques associés à l'obésité (Kjaer and Nilas, 2013).

Selon une revue systématique récente de la littérature, les risques de complications métaboliques (hypertension gestationnelle, diabète gestationnel, pré-éclampsie, césarienne) sont moindres chez les patientes ayant eu recours à la chirurgie bariatrique (Kjaer and Nilas, 2013). Dix-sept études ont mesuré l'impact de cette chirurgie sur la taille du fœtus selon son âge gestationnel et sur le poids des enfants à la naissance. Parmi ces études, huit articles observent une **diminution du poids de naissance**, ainsi que du risque de macrosomie lors de grossesse survenues après chirurgie bariatrique. Une comparaison est faite, soit avec les grossesses avant chirurgie chez les mêmes femmes, soit avec les grossesses dans la cohorte contrôle. Cependant, six articles ne rapportent pas de différences significatives pour ces paramètres (Tableau I, Annexes).

En revanche, 5 études ont mis en lumière le risque accru d'avoir un enfant petit pour l'âge gestationnel. Pour leurs auteurs, **l'évaluation du rapport bénéfice / risque de la chirurgie bariatrique pour la descendance nécessiterait des études sur de plus grandes cohortes** de femmes, en ajustant le poids de celles-ci sur l'IMC (Kjaer and Nilas, 2013).

Une étude a comparé des enfants, âgés de 2,5 à 25 ans, nés avant ou après une opération de chirurgie bariatrique. Tout d'abord, la perte de poids post-chirurgie, chez leur mère, a permis de **diminuer le nombre de macrosomies** et le poids de naissance (Smith et al., 2009). De plus, la prévalence de l'obésité sévère est réduite chez les enfants nés après une chirgurie bariatrique, par rapport aux frères et sœurs nés avant chirurgie (11% vs. 35%, respectivement). La perte de poids maternelle préconceptionnelle, induite par la chirurgie, a également permis d'**améliorer le phénotype métabolique de l'enfant** (profil sanguin lipidique, sensibilité à l'insuline, pression artérielle) (Tableau I, Annexes). Cette étude suggère une **inversion du risque d'obésité** chez la descendance, conditionnée par l'obésité maternelle *in utero*. Des altérations au niveau du méthylome sont mises en évidence dans les cellules sanguines des enfants des mères obèses qui ont eu recours à une chirurgie (Guenard et al., 2013). Toutefois, les mécanismes précis de ce phénomène ne sont pas encore élucidés.

D'après ces résultats, **la chirurgie bariatrique réalisée en période préconceptionnelle, chez les femmes présentant une obésité sévère, aurait un effet plutôt bénéfique sur la descendance à l'issue de la grossesse et à long terme.**

3-2-1) Perte de poids par une intervention nutritionnelle

Chez l'Homme. Une analyse systématique récente des articles publiés entre les années 2000 et 2012, récapitule les études portant sur la perte de poids due à une intervention nutritionnelle, chez des patientes obèses ou en surpoids en période préconceptionnelle (Forsum et al., 2013) (Tableau I, Annexes). Selon cette revue, **aucune étude épidémiologique ne rapporte d'effets, sur l'avenir de l'enfant, d'une perte de poids chez la femme obèse avant la grossesse**. Toutefois, les auteurs concluent que la perte de poids préconceptionnelle a des conséquences bénéfiques pour la mère : amélioration de la fertilité et réduction du risque de développer une pré-éclampsie ou un diabète gestationnel. Tester les effets de l'intervention nutritionnelle précoce sur les cohortes des femmes en surpoids et obèses, pour la descendance, d'un point de vue métabolique, à court et à long terme est donc nécessaire (Catalano and deMouzon, 2015; Forsum et al., 2013; Matusiak et al., 2014).

Chez l'animal. Certaines études ont essayé de répondre, grâce aux modèles animaux, à la question suivante : les effets délétères de l'obésité maternelle sur le phénotype adulte de la descendance pourraient-ils être corrigés par une intervention nutritionnelle avant la conception ?

Une intervention nutritionnelle chez des rattes obèses, en remplaçant leur régime HFD par un régime CD, un mois avant la conception, induit une perte de poids chez ces femelles, leur poids étant de 9 % inférieur à celui des femelles contrôles au moment de la conception, puis à une normalisation de celui-ci pendant la gestation (Tableau I, Annexes). Cette correction de l'obésité chronique engendre un effet à long terme sur le profil métabolique des descendants. Au sevrage, elle permet d'éviter un développement excessif de l'adiposité sous-cutanée, observé chez les descendents de mères obèses. Les niveaux de triglycerides (TG), de leptine et d'insuline plasmatiques sont également restaurés (Zambrano et al., 2010). En revanche, chez les descendants alors âgés de 4-5 mois, la perte de poids maternelle ne permet de rétablir au niveau contrôle ni le niveau de l'insuline, ni le poids du TAB péri-gonadique. La taille des adipocytes est plus élevée chez les descendants des mères obèses, et l'intervention nutritionnelle ne restaure que partiellement ce paramètre (Zambrano et al., 2010). Il semblerait donc qu'une correction de l'obésité plus précoce chez les mères soit nécessaire pour rétablir ces paramètres. **L'intervention nutritionnelle préconceptionnelle permettrait ainsi d'inverser certaines conséquences délétères de l'obésité maternelle chez la descendance.** Il reste à déterminer si la perte de poids a des effets similaires chez les descendantes femelles. De manière intéressante, le poids corporel des descendants, à la naissance ou à l'âge adulte, n'est pas altéré par le régime maternel dans cette étude. Pour la compléter, il faudrait tester la susceptibilité des descendants à développer une obésité et un diabète dans des conditions obésogènes.

Dans une autre étude, l'obésité maternelle a été provoquée par la nutrition hyperglucidique précoce, afin d'étudier la fonction pancréatique chez le fœtus et le phénotype des descendants adultes (Srinivasan, 2005) (Tableau I, Annexes). Des ratons femelles ont reçu une formule de lait hyperglucidique par voie entérale, du 4ème jour post-natal jusqu'au sevrage, ce qui a provoqué obésité, hyperphagie et hyperinsulinémie à l'âge adulte. Ces femelles ont transmis le phénotype de l'obésité à leur descendance, qui présente un poids élevé et une hyperinsulinémie. Les auteurs ont cherché à inverser les effets délétères de l'obésité maternelle chez les descendants, par une perte de poids préconceptionnelle, grâce à une restriction calorique. Les femelles, ayant reçu une formule de lait hyperglucidique, ont été contraintes de consommer la même quantité d'aliments que les rattes contrôles, après le sevrage et pendant la gestation. **Cette intervention nutritionnelle précoce a permis de rétablir le poids initial chez la mère et d'éviter le phénotype observé chez la descendance des mères obèses** : le niveau d'insuline et la réponse du pancréas au glucose chez le fœtus sont normalisés, ainsi que le poids et l'insulinémie à l'âge adulte (Srinivasan, 2005).

Chez la souris, une **normalisation du régime au cours de la lactation** chez la mère obèse est bénéfique pour le poids corporel et le comportement de la descendance (Kang et al., 2014) (Tableau I, Annexes). Régime HFD maternel provoque une anxiété et une sociabilité réduite et une inflammation dans le cerveau chez les descendantes femelles. **L'intervention nutritionnelle permet de restaurer le niveau inflammatoire et normalise le comportement social**. C'est une seule étude qui s'intéresse à une intervention nutritionnelle chez la mère chez la souris. Des effets de la perte de poids préconceptionnelle restent inconnus.

Chez la brebis obèse, l'effet de la normalisation de la consommation alimentaire en période périconceptionnelle sur la croissance fœtale et le transport placentaire a été testé (Tableau I, Annexes). L'obésité a été induite en donnant 150% de la norme nutritionnelle aux femelles. Afin de vérifier l'importance de la période périconceptionnelle dans le conditionnement développemental, la ration quotidienne de ces femelles obèses a été ramenée à 100% de la norme, 2 mois avant la conception et maintenue jusqu'au jour gestationnel 28. A la conception, ces femelles n'ont pas perdu de poids et sont restées obèses. Néanmoins, leurs poids, adiposité, glycémie et insulinémie ont considérablement diminué au cours de la gestation, restant toutefois à un niveau intermédiaire entre ceux des brebis contrôles et obèses (Tuersunjiang et al., 2013). Les fœtus des brebis obèses présentent une macrosomie et une augmentation du poids de plusieurs organes (ventricules cardiaques, reins, pancréas, foie, tissu adipeux péri-rénal) au jour gestationnel 75 (mi-gestation). En revanche, l'épaisseur des ventricules, le poids du foie et du tissu adipeux péri-rénal sont les seuls paramètres altérés à terme, au jour gestationnel 135. **L'intervention nutritionnelle annule les effets négatifs de l'obésité maternelle sur le poids des organes, le poids fœtal, le niveau des TG, du cholestérol, du cortisol et de l'insuline chez le fœtus.** Au niveau du placenta, le niveau protéique des transporteurs du glucose GLUT3 et des acides gras FATP1 est augmenté par l'obésité maternelle. L'intervention nutritionnelle permet une restauration du FATP1, mais pas de GLUT3. En effet, le niveau du glucose chez le fœtus n'est pas restauré dans ce groupe de mères, restant 2 fois plus élevé et à un niveau proche de celui des fœtus obèses.

Dans une autre étude chez le mouton, les auteurs ont étudié l'effet de l'intervention nutritionnelle sur la descendance adulte. La nutrition *ad libitum* a provoqué une obésité chez la brebis, sa consommation alimentaire étant à 170-190% de la norme nutritionnelle (Rattanatray et al., 2010) (Tableau I, Annexes). Afin de séparer les effets de l'obésité en période préconceptionnelle des effets de l'obésité pendant la gestation, un transfert d'embryons dans des brebis receveuses a été effectué à 1 semaine de gestation. L'adiposité est plus élevée chez

les femelles nées de brebis obèses. En revanche, ce paramètre n'est pas altéré chez les descendants mâles à l'âge de 4 mois. **Une restriction alimentaire** des brebis obèses à 70% de la norme, tout au long du mois précédant la conception, **permet d'inverser les effets négatifs chez les descendants femelles**. Ensuite, les auteurs se sont intéressés aux effets de la restriction alimentaire chez les brebis obèses sur des gènes du métabolisme lipidique et de la voie de signalisation de l'insuline dans le foie des descendants (Nicholas et al., 2013a; Nicholas et al., 2014). L'obésité maternelle provoque une dérégulation de l'expression protéique des acteurs de la synthèse et de la β-oxydation des AG dans le foie, mais l'intervention nutritionnelle ne permet pas de restaurer leur niveau (Nicholas et al., 2014). De plus, l'obésité maternelle induit une inhibition de la voie de signalisation de l'insuline au niveau protéique et de l'expression des gènes de la néoglucogenèse. **Une restriction alimentaire permet de supprimer chez l'agneau une partie de ces défauts** (Nicholas et al., 2013a). Dans le muscle squelettique des agnelles de 4 mois, nés des mères obèses, le niveau protéique de GLUT4 est diminué. Le niveau de ce transporteur du glucose insulino-dépendant est restauré par l'intervention nutritionnelle (Nicholas et al., 2013b).

L'ensemble de ces résultats, obtenus sur des modèles animaux, atteste des **effets d'une intervention nutritionnelle, chez la mère en période préconceptionnelle, au niveau du poids corporel ou de la fonction des organes majeurs dans le développement du syndrome métabolique** (foie, pancréas, tissu adipeux, muscle). L'inversion de certains effets de l'obésité maternelle est observée chez les fœtus ou chez les descendants adultes. **Néanmoins, certains paramètres du métabolisme glucidique et lipidique restent altérés par l'obésité maternelle initiale** (Tableau I, Annexes) (Nicholas et al., 2013a; Nicholas et al., 2013b; Nicholas et al., 2014; Tuersunjiang et al., 2013; Zambrano et al., 2010). Cela est probablement dû aux différences entre les espèces et du protocole expérimental (régime, période d'application…).

3-2-2) Perte de poids par un exercice physique

Pour lutter contre l'obésité, une autre stratégie non-invasive consiste à pratiquer régulièrement une activité physique et à respecter un mode de vie actif. Deux études récentes se sont intéressées aux effets de l'exercice physique chez des mères obèses sur le phénotype métabolique des descendants (Vega et al., 2015; Wei et al., 2015). Dans la première étude, une roue a été installée régulièrement dans les cages, afin d'augmenter l'activité physique chez les rattes. Celles-ci ont ainsi eu la possibilité de s'exercer quotidiennement, pendant 30 minutes, le mois précédant la conception, et 15 minutes au cours de la gestation (Vega et al., 2015) (Tableau I, Annexes). Bien que ces rattes obèses n'aient pas perdu de poids grâce à l'exercice, l'activité physique s'avère tout de même bénéfique pour leur santé : la fertilité est restaurée, le métabolisme glucidique, les taux des TG et du cholestérol sont améliorés par rapport aux femelles obèses sédentaires. L'obésité, induite par le régime HFD, a un effet exclusivement sur la descendance mâle. **L'exercice quotidien chez la mère obèse permet d'inverser certaines conséquences métaboliques chez les mâles** : le niveau de leptine est restauré, alors que le niveau des TG est rétabli partiellement.

Chez la souris, une perte de poids maternelle a été induite par un mode de vie actif. Pour ce faire, les femelles ont été élevées dans un environnement dit " enrichi ", c'est-à-dire que leurs cages, plus grandes, ont été équipées de jouets, d'échelles, de roues tournantes, de cabanes etc. Grâce à l'exercice physique pratiqué au cours des 4 semaines avant la conception, ces femelles ont perdu 17% de poids et amélioré de nombreux paramètres métaboliques par rapport aux femelles au mode de vie sédentaire, élevées dans des cages standards (Wei et al., 2015) (Tableau I, Annexes). **L'exercice en période préconceptionnelle a un effet considérable sur le phénotype des descendants adultes mâles et femelles** : leur poids corporel, la prise alimentaire, l'adiposité, la tolérance au glucose, les niveaux d'insuline, de leptine, de cholestérol et des TG dans le sang sont diminués. Dans le foie des descendants, une réduction de l'expression de gènes de la voie de synthèse du cholestérol et de la lipogenèse a été observée, ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la β-oxydation des lipides. Cette dérégulation de l'expression génique a ainsi abouti à une diminution des TG et du cholestérol dans le foie. De manière intéressante, l'exercice physique pratiqué sur une plus courte période, pendant 2 semaines seulement, a produit un effet bénéfique significatif sur la santé maternelle. Il a également permis de conditionner certains paramètres phénotypiques de la descendance, de la même manière que l'exercice physique pratiqué pendant 4 semaines (Wei et al., 2015). Toutefois, **une partie de ces paramètres n'est pas améliorée par l'exercice de**

courte durée : le niveau du cholestérol et des TG hépatiques, ainsi qu'une expression d'une partie des gènes du métabolisme lipidique n'ont pas été rétablis. Cela signifie que la durée de l'activité physique régulière devrait être prise en compte dans les recommandations faites aux femmes obèses pendant leur suivi. De manière intéressante, l'exercice ou la nutrition équilibrée chez les pères obèses permettent également une amélioration du profil métabolique de la descendance, au stade fœtal et à l'âge adulte (McPherson et al., 2013; McPherson et al., 2015).

L'ensemble de ces résultats obtenus chez les rongeurs, prouve que **l'activité physique en période préconceptionnelle, associée ou non à une perte de poids, a un effet bénéfique non-négligeable sur la santé de la descendance adulte.** La pratique d'une activité physique serait souhaitable pour les femmes obèses, le plus tôt possible en amont de la conception de l'enfant, afin d'optimiser les possibilités d'inversion du conditionnement, et de passer d'effet négatif et délétère à un éventuel effet positif sur la santé de la descendance.

Les données discutées dans ce chapitre montrent que **de nouveaux modèles animaux sont nécessaires**, pour répondre à des questionnements sur des effets de l'obésité et de la perte de poids précenceptionnelle chez la mère sur le phénotype de descendants à court et à long terme. Par la suite je vais présenter les connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires pouvant être à l'origine de ces effets.

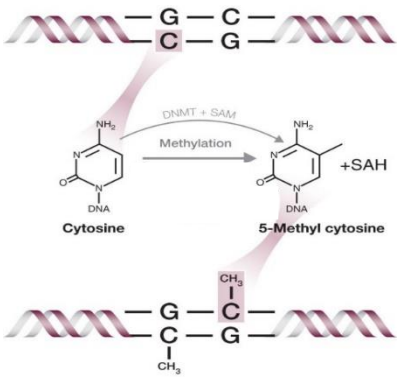


Figure 10. La réaction de méthylation de l'ADN

Un groupement méthyle est ajouté sur le carbone 5' d'une cytosine suivie d'une guanine (dinucléotide CpG) par les ADN méthyltransférases (DNMTs). Ces enzymes utilisent le S-adenosyl-methionine (SAM) comme donneur universel de groupe méthyle.

Adapté du site *https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2153*

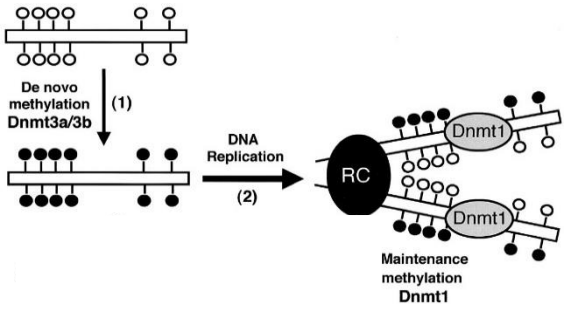


Figure 11. Les différents rôles des ADN méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3a/3b

1) Un groupement méthyle est ajouté par les ADN méthyltransférases (DNMTs) *de novo*, DNMT3a et DNMT3b, sur les séquences non-méthylées (ronds blancs), au niveau des CpGs symmétriques.
2) Au cours de réplication de l'ADN, le nouveau brin devient hemi-méthylé.
3) La DNMT1, ADN méthyltransférase de maintenance, se trouve dans le complexe de réplication. Cette enzyme intervient au niveau des séquences hémi-méthylées et permet le maintien de la méthylation dans les deux cellules filles.

RC - replication complex.

Adapté de Chen et al., 2003

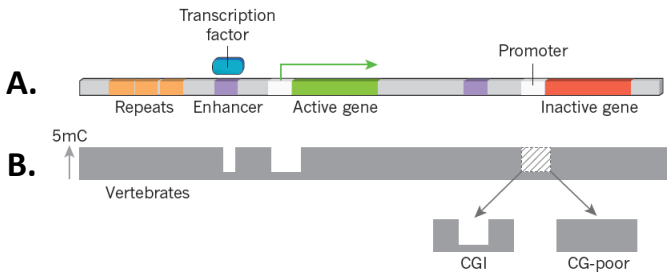


Figure 12. Distribution des cytosines méthylées dans le génome

(A) Deux gènes sont représentés: un gène avec une transcription active (en vert) et un gène réprimé (en rouge). Des éléments régulateurs sont présentés pour chaque gène: proximal (le promoteur, en blanc), à côté de site d'initiation de transcription (TSS, avec une flèche verte), et distal (enhanceur, en violet). Les séquences répétées sont en orange, le facteur de transcription – en bleu.

(B) La méthylation de l'ADN (5mC) est indiquée en gris (la hauteur de la barre représente la proportion de la méthylation). Les promoteurs à îlots CpG sont généralement hypométhylés, permettant une répression de gène. Dans le cas des promoteurs pauvres en CpG, la méthylation est généralement associée avec la répression de la transcription.

TSS – transcription start site, 5mC – 5-méthylcytosine, CGI – îlot CpG, CpG / CG – dinucléotide cytosine–phosphate–guanine.

Adapté de Schübeler et al., 2015

Chapitre II. Epigénétique et environnement

1) Introduction à l'épigénétique et principales marques épigénétiques

L'épigénétique est l'étude des mécanismes qui régulent l'expression génique sans modification de la séquence de l'ADN. Il existe trois mécanismes principaux : la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARN non-codants (Gibney and Nolan, 2010). Les marques épigénétiques sont des modifications covalentes, ce qui leur confère une certaine stabilité. Ainsi, elles peuvent être transmises au cours des divisions cellulaires, d'où la notion selon laquelle les marques épigénétiques sont " héritables ". La totalité des marques épigénétiques d'une cellule constitue ce que l'on appelle l'épigénome. Cependant, ces marques peuvent être réversibles sous l'influence de facteurs variés.

La **méthylation de l'ADN** consiste, chez les eucaryotes, en l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone 5' d'une cytosine suivie d'une guanine (dinucléotide CpG) (Schübeler, 2015). Les CpG sont sous-représentés dans le génome des mammifères, sauf dans les îlots CpG (Jones and Takai, 2001). Ces îlots sont définis selon plusieurs critères : ce sont des régions de plus de 200 paires de bases, avec un contenu en cytosines et guanidines supérieur à 55% et un ratio de dinucléotides CpG observé/attendu supérieur à 0,65. Les îlots CpG se trouvent principalement au niveau de promoteurs de gènes, et de régions répétées du génome.

Les enzymes qui catalysent cette réaction, les **ADN méthyltransférases** (DNMTs), utilisent le substrat S-adenosyl-methionine (SAM) comme donneur universel de groupe méthyle (Figure 10) (Gibney and Nolan, 2010). Il existe deux ADN méthyltransférases *de novo*, DNMT3a et DNMT3b, qui ont une affinité pour les séquences non-méthylées (Figure 11). DNMT1 reconnait les CpGs hémiméthylés et permet de maintenir le profil de méthylation au cours des divisions cellulaires (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005). Enfin, la protéine DNMT3l (DNMT3-like), bien que sans activité méthyltransférase, est indispensable pour la méthylation de l'ADN. En se liant aux DNMT3a et DNMT3b, elle augmente leur activité (Suetake et al., 2004).

Chez les mamifères, 5 à 8% des cytosines sont méthylées et le degré de méthylation varie selon le tissu (Schübeler, 2015). Il a longtemps été admis que la méthylation de l'ADN,

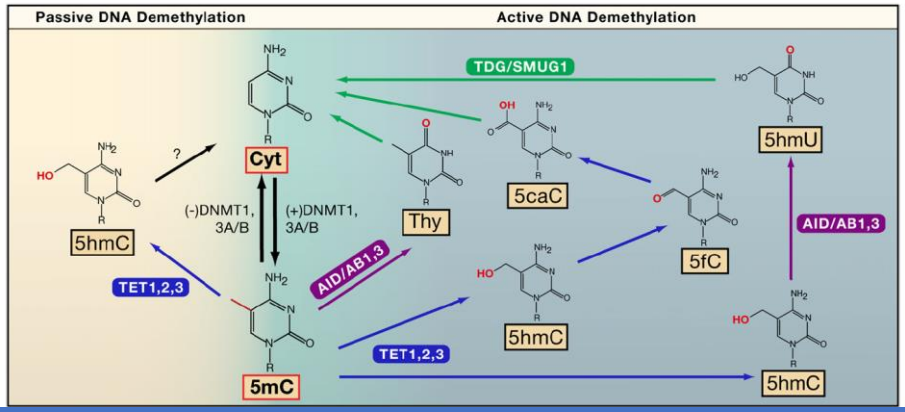


Figure 13. Les mécanismes de la déméthylation de l'ADN

La déméthylation de l'ADN passive se produit en absence des DNMTs, qui sont responsables de l'apposition d'un groupement méthyle sur la cytosine (flèches noires). Les membres de la famille TET (en bleu) convertissent la 5mC (cytosine méthylée) en 5hmC (cytosine hydroxyméthylée). Par la suite, la 5hmC peut être oxydée en 5fC (5-formylcytosine) et 5caC (5-carboxylcytosine). La 5mC peut être désaminée par la famille AID/APOBEC (en violet) pour former le 5mU (5-méthyluracil) ou 5hmU (5-hydroxyméthyluracil). Les 5mU, 5hmU et 5caC sont remplacés en C par réparation par excision de base, médiée par TDG/SMUG1 (en vert), culminant la déméthylation de l'ADN. TET - Ten Eleven Translocation enzyme methylcytosine dioxygenase, AID/APOBEC - activation-induced cytidine deaminase / apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like, TDG/SMUG1 - thymine DNA glycosylase / single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase

Adapté de Bhutani et al., 2011

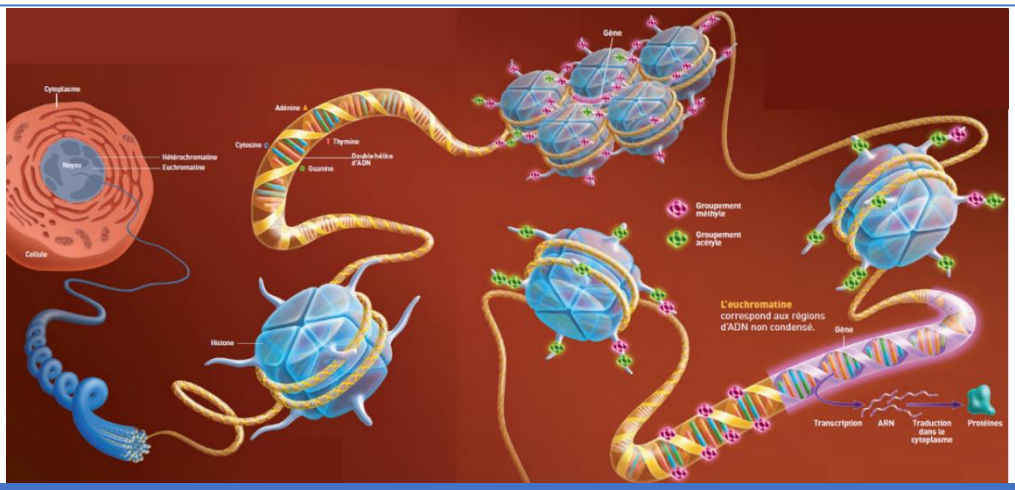


Figure 14. Les marques épigénétiques qui régulent la transcription génique

L'organisation de la chromatine : le double brin d'ADN est enroulé autour du nucléosome, un octamère protéique comprenant quatre dimères d'histones (H3, H4, H2a, H2b). Les parties N- et C-terminales des histones, dirigées vers l'extérieur du nucléosome, sont accessibles aux enzymes de la machinerie épigénétique. Le groupement méthyle (en rose) est apposé sur les dinucleotides CpG de l'ADN. L'acétylation des histones (en vert) est associée avec l'euchromatine, régions ouvertes et accessibles pour la machinerie transcriptionnelle. La méthylation des histones peut être associée avec l'expression génique active ou réprimée, selon la position spécifique de groupement méthyle sur les histones.

Adapté de Heard et al., 2012

dans la région promotrice, était généralement associée à une répression de la transcription des gènes, mais des données plus récentes montrent une réalité plus complexe (Figure 12).

A ce jour, 3 mécanismes sont proposés pour la **déméthylation de l'ADN**. Une déméthylation passive se produit au cours des divisions cellulaires, en absence des DNMTs de maintien, ou en cas de réduction de leur activité. Une déméthylation active, perte du groupement méthyle, pourrait être due à des enzymes possédant une activité de déméthylation de l'ADN, mais qui ne sont pas encore découvertes à ce jour. Une déméthylation active par modification du groupe méthyle, l'hydroxyméthylation, est décrite (Bhutani et al., 2011). Les membres de la famille TET (Ten Eleven Translocation enzyme methylcytosine dioxygenase) catalysent la conversion de la 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) (Figure 13). Par la suite, la 5hmC peut être oxydée en 5fC (5-formylcytosine) et 5caC (5-carboxylcytosine). La 5mC peut être aussi désaminée par les membres de la famille AID/APOBEC (activation-induced cytidine deaminase / apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) pour former le 5mU (5-méthyluracil) ou 5hmU (5-hydroxyméthyluracil). Les 5mU, 5hmU et 5caC sont remplacés par C par les ADN glycosylases TDG/SMUG1 (thymine DNA glycosylase/singlestrand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase), impliqués dans la réparation de l'ADN par excision de base.

Le deuxième type de marques épigénétiques importantes sont les **modifications post-traductionnelles des histones**. Chez les eucaryotes, le matériel génétique, localisé dans le noyau, est organisé en chromatine, dont l'unité fondamentale est le nucléosome (Figure 14). Environ 146 paires de bases d'ADN sont enroulées autour d'un octamère protéique comprenant quatre dimères des histones H3, H4, H2a, H2b (Bonifer and Cockerill, 2011). L'histone de liaison H1 n'est pas incluse dans l'octomère du nucléosome, mais elle fixe et maintient l'ADN en place, permettant de maintenir la structure du nucléosome. Les protéines histones présentent une partie globulaire et des queues N- et C-terminales. Les parties globulaires forment le cœur du nucléosome. Les parties N- et C-terminales des histones, dirigées vers l'extérieur du nucléosome, sont donc accessibles aux enzymes de remodelage de la chromatine.

Il existe au moins 11 types de modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles la méthylation et l'acétylation de la lysine sont les plus étudiées. Plusieurs résidus peuvent être modifiés sur chaque histone, ce qui crée, avec environ une centaine de marques différentes, une multitude de combinatoires (Bonifer and Cockerill, 2011) (Figure 15). L'ensemble des modifications des histones représentent un **"code des histones"**. Concernant la **nomenclature des modifications**, le numéro de l'histone est suivi par le résidu modifié, lysine (K) ou arginine

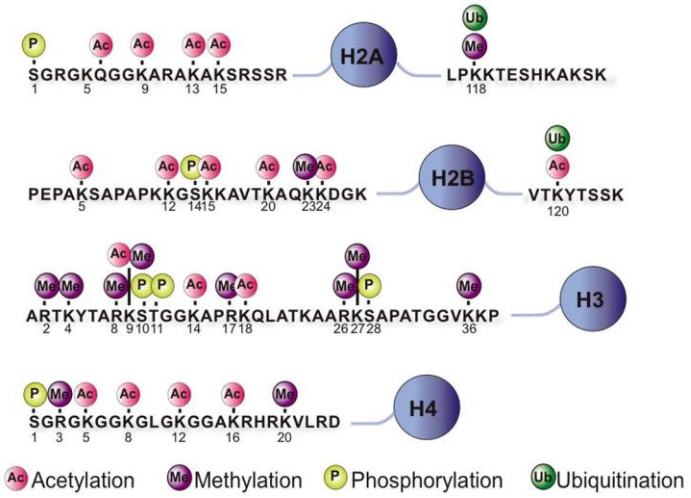


Figure 15. Les modifications post-traductionnelles des histones

Différents types de modifications chimiques (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination) sont possibles sur des acides aminés des queues des histones (H2A, H2B, H3, H4).

Adapté de Kato et al., 2010

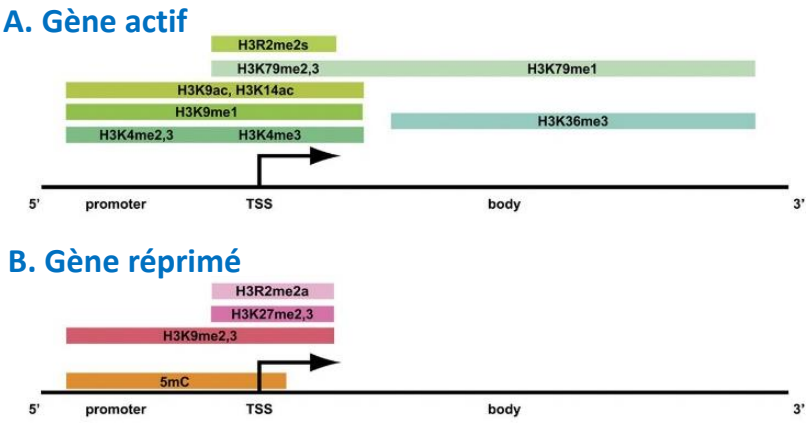


Figure 16. La régulation de la transcription génique par des marques épigénétiques

A) La distribution des marques épigénétiques au niveau du promoteur, du site d'initiation de la transcription (TSS) et du corps d'un gène transcriptionellement actif.

B) La distribution des marques dans le cas de la transcription réprimée.

Les marques activatrices sont représentées en nuances de vert et répressives en nuances de rose. La méthylation de l'ADN est en orange.

Adapté de Batler et al., 2013

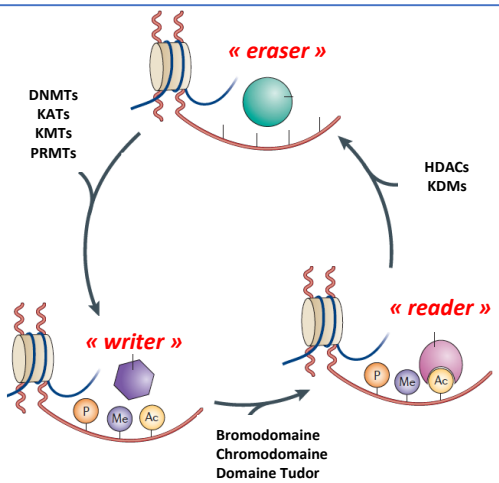


Figure 17. *« Writers », « erasers »* et *« readers »* des marques épigénétiques

« *Writers* » (DNMTs, KATs, KMTs, PRMTs) apposent des marques épigénétiques.
« *Readers* » (protéines à bromodomaine, chromodomaine ou à domaine Tudor) reconnaissent ces marques et recrutent des autres acteurs épigénétiques. « *Erasers* » (HDACs, KDMs) enlèvent les marques de l'ADN ou des histones.

Adapté de Falkenberg et al., 2014

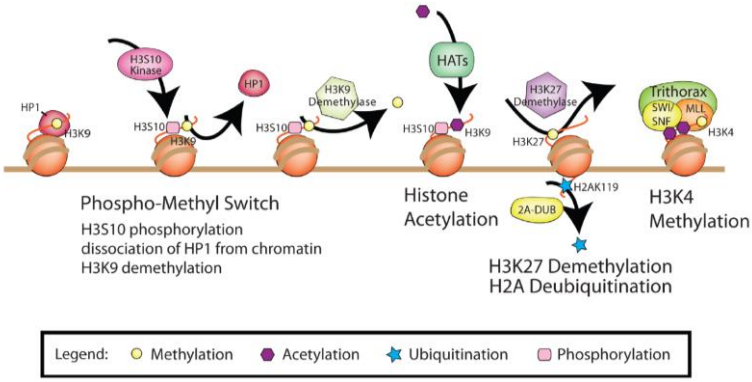
(R), et le numéro indiquant sa position sur l'histone. Le type de modification est indiqué (me – méthylation, ac – acétylation, p – phosphate, ub – ubiquitine) à la fin, ainsi que le nombre des modifications (dans le cas de méthylation - 1, 2 ou 3 pour mono-, di- or tri-méthylation). Par exemple, H3K9me3 signifie une triméthylation sur la lysine 9 de l'histone 3. **Les marques épigénétiques contrôlent le niveau de condensation de la chromatine** et l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription, donc l'expression génique (Figure 14) (Gibney and Nolan, 2010). **L'euchromatine** est associée aux marques "activatrices", et correspond à des régions de la chromatine "ouvertes". En revanche, les gènes transcriptionnellement inactifs sont situés au niveau de **l'hétérochromatine**, qui présente des marques "répressives" (Kouzarides, 2007). L'acétylation des histones (H3ac, H4ac, H3K9ac, H3K14ac...) est corrélée à une activation de la transcription (Figure 16). L'effet de la méthylation des histones dépend du résidu modifié : H3K4me, H3K36me et H3K79 sont des marques "activatrices", alors que H3K9me, H3K27me, H3K9me, H3K27me et H3K20me sont " répressives ".

Les enzymes de la machinerie épigénétique régulent l'apposition ou l'enlèvement des marques sur l'ADN ou sur les histones. Celles qui apposent ces marques sont référencées dans la littérature comme **"*writers*"** : elles " écrivent " le code épigénétique. En revanche, les enzymes qui enlèvent les marques sont appelées **"*erasers*"** (Figure 17). Par exemple, les lysines acétyltransférases (KATs) ajoutent l'acétyle sur les histones, tandis que la désacétylation est médiée par les histones désacétylases (HDACs et sirtuines). De même, les enzymes de la famille des histones méthyltransférases (HMTs) apposent le groupement méthyle, alors que les histones déméthylases (HDMs) l'enlèvent.

Les marques épigénétiques sont reconnues par un grand nombre de protéines régulatrices, appelées **"*readers*"**, possédant des **domaines protéiques spécifiques**. Par exemple, les protéines contenant le bromodomaine reconnaissent l'acétylation des histones. Les protéines contenant un Methyl Binding Domain (MBD) se lient à l'ADN méthylé. Les "*readers*" du code épigénétique permettent de **recruter des complexes multiprotéiques** contenant souvent d'autres enzymes de la machinerie épigénétique, contribuant ainsi à la régulation de la transcription.

Il existe un dialogue entre les marques des histones et la méthylation de l'ADN (Fuks, 2005; Gabory et al., 2011; Kouzarides, 2007). La méthylation de l'ADN et des modifications des histones agissent ensemble pour réguler l'expression génique et la conformation de la chromatine. La régulation de l'expression génique par la machinerie épigénétique est schématisée sur la Figure 18. Les régions du génome transcriptionnellement actives sont

A. **Machinerie épigénétique impliquée dans l'activation de l'expression génique**



B. **Machinerie épigénétique impliquée dans la répression transcriptionnelle**

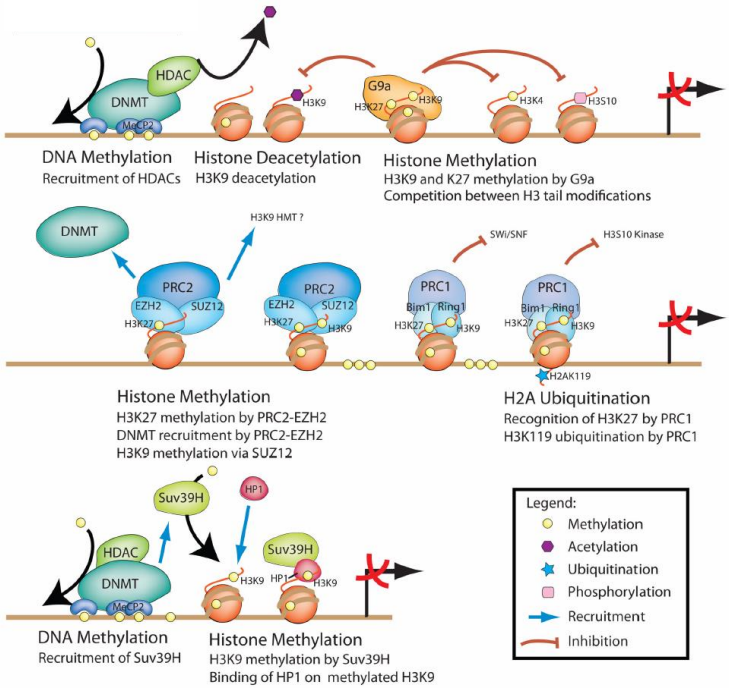


Figure 18. La régulation de l'expression génique par la machinerie épigénétique

(A) Un changement de conformation de la chromatine permet une activation de la transcription. Cette activation nécessite le recrutement de complexes multiprotéiques activateurs, contenant des « *writers* » : HATs et des HMT (Tritorax). Les « *erasers* » (HDACs, HP1), au contraire, ne sont pas présents au niveau des gènes actifs.

(B) Des interactions des régulateurs de la chromatine avec les marques épigénétiques permettent une répression transcriptionnelle du gène. La méthylation de l'ADN est catalysée par les DNMTs. Les protéines à MBD (methyl binding domain), par exemple MeCP2, reconnaissent le groupement méthyle et recrutent les HDACs et les HMTs, qui répriment la transcription d'avantage.

DNMT – ADN méthyltansférases, MeCP2 – methyl CpG binding protein 2, HDAC – histones désacétylases, HP1– heterochromatin protein 1, PRC – complexe répressif Polycomb, Suv – supressor of variegation, SWI/SNF (switch/sucrose nonfermentable), MLL – mixed-lineage leukemia, HAT – histones lysine transférases.

Adapté de Delage et al., 2008

associées à un enrichissement par des "*writers*" (KATs ; certaines HMTs membres du complexe Tritorax...) et, par conséquent, par des marques "activatrices" (Delage and Dashwood, 2008). En parallèle, ces régions sont dépourvues des "*erasers*" (HDACs, certaines KDMs). Cette signature épigénétique permet un changement de conformation de la chromatine et une activation de la transcription. Quant à état transcriptionnellement inactif, la méthylation de l'ADN est reconnue par les MBDs, par exemple MeCP2 (methyl CpG binding protein 2), qui recrute par la suite des "*erasers*" des marques "activatrices" ou des "*writers*" des marques " répressives ". Les relations entre marques épigénétiques et complexes de remodelage de la chromatine ne sont pas encore bien définies à ce jour.

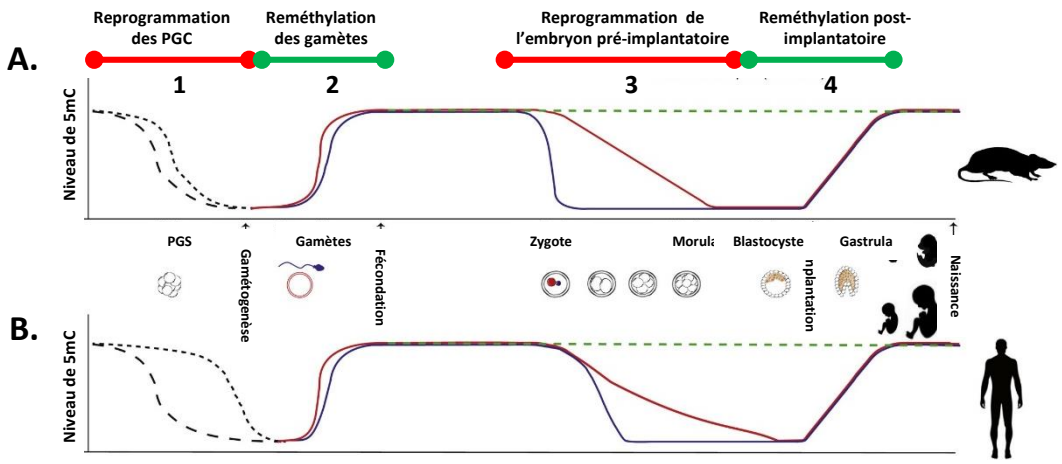


Figure 19. Comparaison de la dynamique de méthylation du génome au cours du développement entre la souris (A) et l'homme (B).

Au cours de la gamétogenèse, le génome est fortement déméthylé (1), puis reméthylé (2), afin de mettre en place un méthylome spécifique des gamètes. Immédiatement après la fécondation, une phase de déméthylation du génome a lieu dans le zygote (3), afin d'établir un programme d'expression totipotent dans le blastocyste. La perte de méthylation a une dynamique différente dans les deux génomes : le génome paternel subi une déméthylation active, alors que maternel – une déméthylation passive. Le niveau de méthylation le plus bas est observé dans le blastocyste. Un nouveau profil de méthylation de l'ADN est apposé après l'implantation (4), pour installer un programme d'expression tissu-spécifique dans l'embryon.

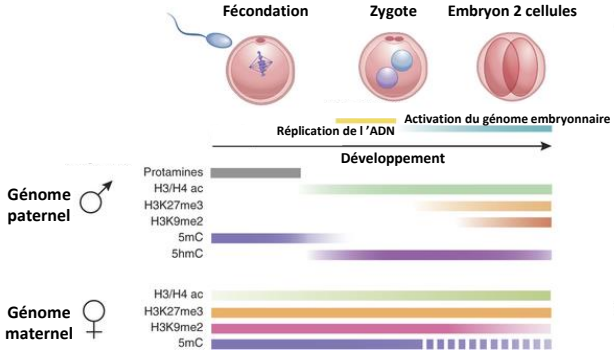
Lignes pointillées noires : niveau de la méthylation dans les cellules primordiales germinales (PGC). Lignes pointillées vertes : établissement et maintien de la méthylation des régions différentiellement méthylées (DMRs) des gènes à empreinte. Lignes bleues : niveau de la méthylation du génome mâle. Lignes rouges : niveau de la méthylation du génome femelle.

DMR - differentially methylated regions, PGC – primordial germ cells

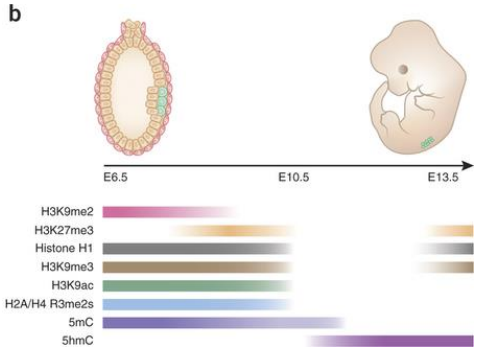
Adapté de Monk et al., 2015

Figure 20. Reprogrammation épigénétique du génome paternel et maternel après la fécondation

A. Reprogrammation dans le zygote



B. Reprogrammation au cours du développement des cellules germinales



C. Dynamique de l'acétylation et de la méthylation des histones au cours du développement précoce

Modification des histones	Stade une cellule	Stades suivants (jusqu'au blastocyste)
H4K12ac H4K8ac	mPN, pPN	A la périphérie nucléaire à 2 cellules
H3K9ac H3K14ac H3K18ac	mPN, pPN	A la périphérie nucléaire à 2 cellules
H4K16ac		Présent à 2 cellules
H4K5ac	mPN, pPN	A la périphérie nucléaire à 2 cellules
H3K27ac		Indétectable
H3K4me1	mPN, pPN	
H3K4me2	mPN	Présent à 2 cellules
H3K4me3	mPN; pPN	
H3K9me1	mPN, pPN	-
H3K9me2	mPN	Présent jusqu'à blastocyste
H3K9me3	mPN	Présent jusqu'à blastocyste
H3K27me1	mPN, pPN	-
H3K27me2	mPN, pPN	-
H3K27me3	mPN, pPN	Présent jusqu'à blastocyste, après ICM > TE
H3K36me3	mPN	Faible marquage à 4 cellules
H4K20me1	mPN, pPN	↓ à partir de stade morula
H4K20me2	Indétectable	Détectable à partir de 4 cellules
H4K20me3	mPN	Indétectable
H3R17me	mPN, pPN	Présent jusqu'à blastocyste
H4R3me	Undetectable	↑ au cours du développement

ICM – masse cellulaire interne, TE – trophectoderm, PGC – primordial germ cells; H – histone, K – lysine, R – arginine, me – méthylation, ac – acétylation, 5mC – cytosine méthylée, 5hmC - cytosine hydroxyméthylée, E – jour embryonnaire

(A) Une reprogrammation épigénétique est nécessaire dans le zygote, pour l'activation du génome embryonnaire (entre le stade de zygote et 2 cellules). Les épigénomes paternel et maternel présentent des programmes de reprogrammation différents : certaines marques des histones sont identifiées uniquement dans le pronoyau maternel ou paternel, d'autres dans les deux. Le génome paternel subi une reprogrammation au stade zygote, alors que le génome maternel perd progressivement les marques répressives au cours des divisions cellulaires

Adapté de Cantone et al., 2013

(B) Les cellules primordiales germinales (PGC, en vert) se spécifient à partir de E6.5 et migrent ensuite vers les crêtes génitales (E7.5-E10.5). Après E10.5, un effacement des marques est observé avec une remise des marques épigénétiques ultérieure, qui permet une maturation des spermatozoïdes et des ovocytes

Adapté de Cantone et al., 2013

(C) Modifications des histones présentes dans les pronoyaux maternel et paternel (mPN et pPN, respectivement) au stade une cellule et par la suite, jusqu'au stade blastocyste

Adapté de Beaujan, 2014

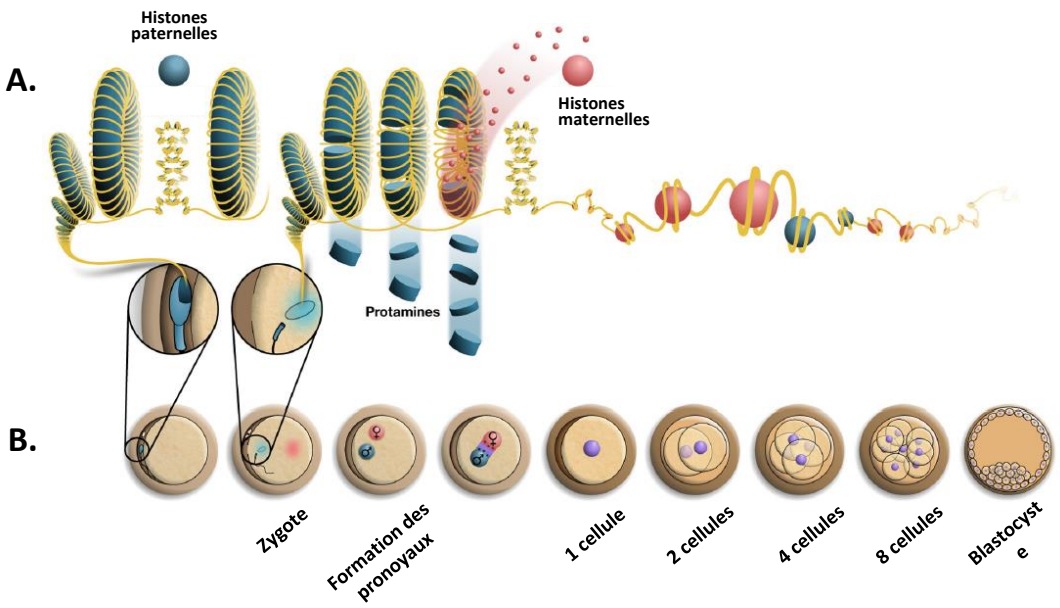


Figure 21. Altérations de la conformation de la chromatine paternelle après la fécondation et jusqu'au stade blastocyste

(A) Structure de la chromatine du génome paternel au cours du développement précoce. La chromatine d'un spermatozoïde mature est hautement compactée, contenant des protamines (cylindres bleus) mais avec une rétention de histones paternelles (sphères bleus). Immédiatement après la fécondation, les protamines sont rapidement remplacées par les histones maternelles (sphères rouges), permettant une décompaction de la chromatine paternel.

(B) Différentes étapes du développement embryonnaire précoce après la fécondation. Au cours de la fécondation, le spermatozoïde pénètre à travers la zone pellucide de l'ovule. Le zygote est ainsi formé, contenant le matériel génétique maternel et paternel. Les pronoyaux maternel et paternel sont formés par la suite. Le zygote subit une série de divisions successifs en commençant par le stade 2 cellules (blastomères) et jusqu'à atteindre le stade blastocyste.

Adapté de Jenkins et al., 2012

2) Marques épigénétiques et développement embryonnaire

Toutes les cellules de l'organisme ont le même génome et ce sont les marques épigénétiques qui établissent un profil d'expression tissu-spécifique, une identité cellulaire (Barrero et al., 2010). L'épigénétique serait un des **mécanismes de "mémorisation"** de cette identité cellulaire, car des marques épigénétiques sont des modifications stables qui peuvent persister après la disparition d'un facteur déclenchant (D'Urso and Brickner, 2014). La lecture des marques change l'expression des gènes, contrôlant ainsi le phénotype, et ce tout au long de la vie de l'individu.

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est nécessaire pour que l'embryon se développe correctement (Hackett and Surani, 2012). La dynamique de modifications des histones a également son importance pendant le développement embryonnaire (Beaujean, 2014; Cantone and Fisher, 2013). Au cours du développement, ces marques épigénétiques subissent un remodelage important, afin de définir l'identité cellulaire. Il existe **deux phases de "remise à zéro", ou de "reprogrammation" épigénétique** (Figure 19 et 20) (Cantone and Fisher, 2013).

Au cours de la gamétogenèse, à partir d'E10.5 chez la souris, le génome des cellules primordiales germinales (PGC, primordial germ cells) subit un effacement des marques épigénétiques : déméthylation de l'ADN, perte de l'histone H1 et de marques des histones, répressives et activatrices (Figure 19A, 20B). Ensuite, le génome acquiert une méthylation de l'ADN et des modifications spécifiques des histones, afin de mettre en place un profil spécifique aux gamètes, en fonction du sexe (Cantone and Fisher, 2013; Hackett and Surani, 2012). La majorité du génome d'un spermatozoïde est fortement méthylée par rapport à l'ovocyte (Casas and Vavouri, 2014). La chromatine d'un spermatozoïde est hautement compactée, les histones étant remplacées en quasi-totalité par les protamines, et transcriptionnellement inactive (Adenot et al., 1991) (Figure 21).

Une 2ème phase d'effacement des marques épigénétiques a lieu immédiatement **après la fécondation**. Une remise à zéro et la reprogrammation épigénétique sont nécessaires dans le zygote, afin d'établir un programme d'expression totipotent (Cantone and Fisher, 2013). **La cinétique de déméthylation de l'ADN semble différente dans les deux génomes provenant du gamète mâle et du gamète femelle** (Hackett and Surani, 2012; Monk, 2015) (Figure 19).

Le génome paternel subit une déméthylation à la fois passive et active et plus rapide, grâce à l'hydroxyméthylation de l'ADN. En revanche, la perte passive de la méthylation du génome maternel est observée au cours des divisions cellulaires. Il existe de légères différences au niveau de la cinétique de la déméthylation de l'ADN entre la souris et l'homme. La perte de méthylation semble être plus rapide dans les PGC, ainsi que dans le zygote chez la souris, par rapport à l'homme (Monk, 2015) (Figure 19).

Le **remodelage de la chromatine** est nécessaire au cours de la formation des deux pronoyaux parentaux et au cours des stades suivants, afin de permettre une activation de l'expression génique de l'embryon (Beaujean, 2014). Après la fécondation, les protamines du spermatozoïde sont rapidement remplacées par les histones d'origine maternelle, permettant ainsi une décompaction de la chromatine paternelle (Jenkins and Carrell, 2012) (Figure 21). Les épigénomes des gamètes parentaux présentent de considérables différences : certaines marques des histones sont identifiées uniquement dans le pronoyau maternel ou paternel, d'autres dans les deux (Beaujean, 2014) (Figure 20C). Par exemple, au stade 1-cellule, au moment de la formation du pronoyau paternel, la chromatine paternelle devient hyperacétylée au niveau de l'histone H4 (Adenot et al., 1997). Les histones au niveau du génome maternel, au contraire, sont plus méthylées (Beaujean, 2014) (Figure 20A). Par la suite, au cours des différents stades du développement précoce, diverses modifications des histones sont présententes dans l'embryon, formant une signature épigénétique spécifique de chaque stade (Figure 20C). **L'apposition d'un nouveau profil épigénétique, au niveau de la méthylation de l'ADN et des marques des histones, a lieu suite à la gastrulation, permettant la différenciation cellulaire** (Figure 19 et 20A).

L'apposition et l'enlèvement des marques des histones et de la méthylation de l'ADN sont ainsi hautement dynamiques, et cruciales pour le développement embryonnaire. Des perturbations de la reprogrammation épigénétique de l'embryon, ou de la machinerie enzymatique qui régule ce processus, pourraient avoir des conséquences sur la survie et la santé future du fœtus (Gabory et al., 2011; Lane et al., 2014).

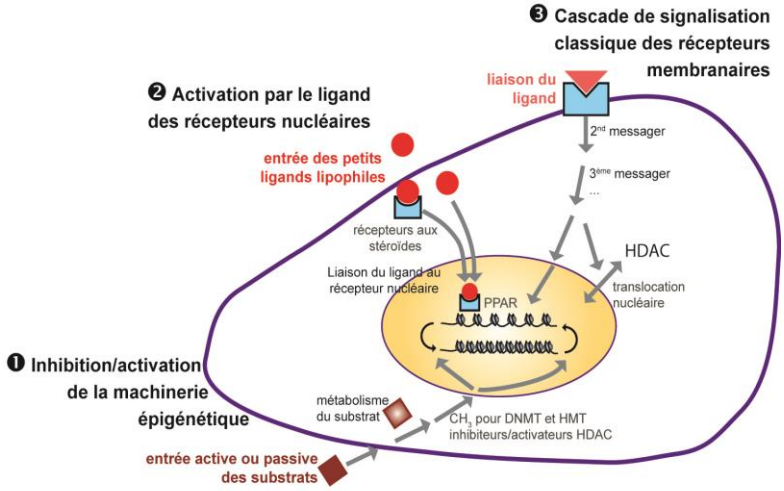


Figure 22. Mécanismes reliant les facteurs environnementaux à des modifications épigénétiques

Trois mécanismes sont en jeu:

1) Action directe sur la machinerie épigénétique : les substrats alimentaires participant au métabolisme monocarboné (donneur de -CH3) sont impliqués dans la méthylation, alors que d'autres substrats alimentaires régulent l'activité des enzymes de la machinerie épigénétique.

2) La fixation du récepteur nucléaire en présence de ligand peut entraîner localement une modification du profil épigénétique et influencer à long terme l'expression des gènes ciblés.

3) Les cascades de signalisation classiques peuvent comporter dans leurs messagers des activateurs/répresseurs d'enzymes de la machinerie épigénétique.

Adapté de Gabory et al., 2011

Cofacteur	Processus métabolique	Enzyme épigénétique
SAM	Métabolisme monocarboné (folates, choline, méthionine etc.)	ADN méthyltransférases (DNMTs)
		Histones méthyltransférases (HMTs)
Acétyl-CoA	β-oxydation des lipides, cycle de l'acide citrique	Histones acétyltransférases (HATs)
NAD^+	Cycle de l'acide citrique, réaction d'oxydoréduction	Sirtuines (histones désacétylases)
FAD	Cycle de l'acide citrique, réaction d'oxydoréduction	Kdm1a (Lsd1)
α-cétoglutarate	Cycle de l'acide citrique, catabolisme de glutamine	TETs
		Histones déméthylases (HDMs) – famille JmjC
ATP	Chaine de transport des électrons	complexes SWI/SNF (remodelage de la chromatine)

Tableau 3. Métabolites co-facteurs ou substrats des enzymes épigénétiques

SAM – S-adénosylméthionine, Acétyl-CoA – Acétyl-coenzyme A, NAD+ – Nicotinamide adénine dinucléotide, FAD – Flavine adénine dinucleotide, ATP – adénosine-5′-triphosphate, Kdm - lysines déméthylases, TET - Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase, JmjC - Jumonji C, SWI/SNF - SWItch/Sucrose Non-Fermentable.

Adapté de Donohoe and Bultman, 2012

3) Epigénétique: lien entre environnement et génome

Alors que l'information génétique est extrêmement stable, les marques épigénétiques sont flexibles, ce qui leur confère une sensibilité aux stimuli environnementaux, provenant de l'extérieur, et aux stimuli intrinsèques (Attig et al., 2010). De nombreux facteurs métaboliques, nutritionnels, aussi variés que le stress et l'activité physique, ont une influence sur la machinerie épigénétique. Trois mécanismes possibles reliant ces facteurs à la conformation de la chromatine et, en conséquence, à la régulation transcriptionnelle ont été proposés (Gabory et al., 2011) (Figure 22). Premièrement, **des nutriments et des métabolites peuvent être des inhibiteurs/activateurs ou des cofacteurs des enzymes de la machinerie épigénétique** (Tableau 3). Par exemple, les inhibiteurs des HDACs sont connus : le sulforafane contenu dans le brocoli et des organosulfurés contenus dans l'ail (Delage and Dashwood, 2008). Le resvératrol contenu dans le vin rouge, au contraire, augmente l'activité des désacétylases de type sirtuine. Certaines KATs peuvent être inhibées par le polyphénol, la curcumine, issu des racines du curcuma, la lunasine contenue dans le soja, le blé et l'orge, le garcinol contenu dans la zeste de garcinia (kokum) et l'acide anacardique contenu dans la coque de noix de cajou (Donohoe and Bultman, 2012). Ainsi, les acides gras à chaine courte, par exemple le butyrate, peuvent inhiber l'activité des histones désacétylases (HDACs) (Davie, 2003). Le butyrate est produit par le microbiote intestinal au cours de la fermentation des fibres. De plus, le rapport de NAD^+/NADH (nicotinamide adénine dinucléotide), indicateur du statut énergétique de la cellule, a une influence directe sur l'activité désacétylase des sirtuines (Burdge and Lillycrop, 2014). L'acétyl-coenzyme A (Acetyl-CoA), issu de l'oxydation des lipides et du pyruvate, est un substrat de la réaction de l'acétylation des histones effectuée par les lysines acétyltransférases (KATs) (Donohoe and Bultman, 2012). L'ion ferreux (Fe^{2+}) est un cofacteur des membres de la famille TET et des histones déméthylases (Donohoe and Bultman, 2012). L'activité des HDACs dépend de l'ion de zinc (Zn^{2+}) provenant de la nutrition (Seto and Yoshida, 2014).

La méthylation de l'ADN et des histones pourrait être impactée par un apport du groupement méthyle via le métabolisme monocarboné, ou la voie de métabolisation des folates et de la méthionine. Les nutriments (choline, méthionine, vitamines B12, B2, B6, B9) interviennent dans ce métabolisme monocarboné qui régule la quantité de S-adénosylméthionine (SAM), nécessaire pour les ADN méthyltransférases, les arginines méthyltransférases (PRMTs, protein arginine N-methyltransferases) et les lysines

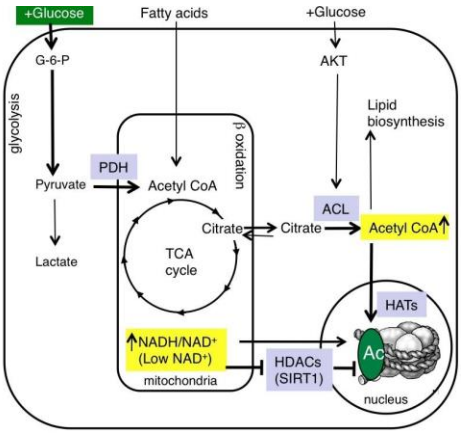


Figure 23. Mécanismes reliant le statut nutritionnel de l'organisme et l'acétylation des histones

Adapté de Donohoe and Bultman, 2012

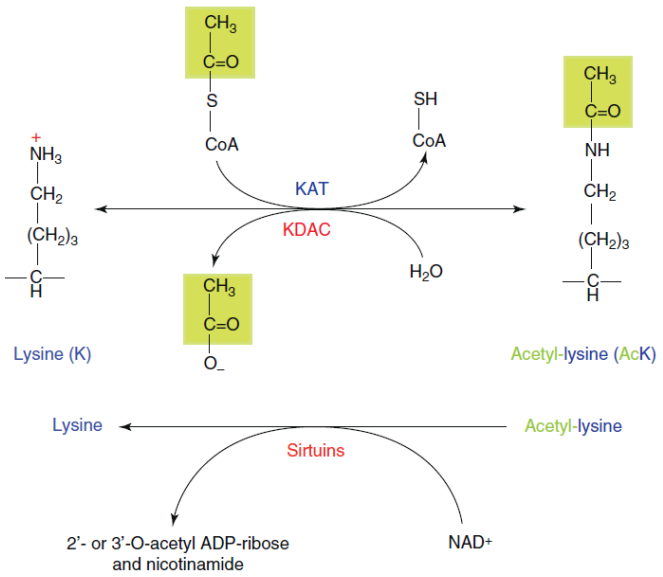


Figure 24. Réactions d'acétylation des histones par les lysine acétyltransférases (KATs) et de désacétylation par les lysine désacétylases (HDACs) et les Sirtuines

(A) La lysine des histones a une charge positive. Les KATs transfèrent le groupement acétyle (en vert), issu de l'Acétyl-Coenzyme A, sur la lysine des histones. Cette modification neutralise la charge positive, permettant l'ouverture de la chromatine. La réaction inverse peut être médiée par les HDACs de classe I, II et IV, avec le relâchement de l'acétate, ou par les Sirtuines.

(B) Les sirtuines, les histones désacétylases de classe III, utilisent le cofacteur NAD^+ pour la réaction de la désacétylation des histones.

Adapté de Kim et al., 2011

méthyltransférases (KMTs) (Donohoe and Bultman, 2012; Junien et al., 2005). Les altérations de l'apport de ces nutriments peuvent influencer le niveau de la méthylation de l'ADN et des histones (Kovacheva et al., 2007).

Deuxièmement, **certains récepteurs nucléaires**, tels que les PPARs (peroxysome proliferator–activated receptors) ou le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR), **recrutent des enzymes de la machinerie épigénétique**. Grâce à un remodelage de la chromatine, ils régulent la transcription de leurs gènes cibles. Par exemple, une liaison de PPARγ à ses ligands, acides gras polyinsaturés, et le RXR (retinoid X receptor) mène au recrutement des coactivateurs, lysine acétyltransférases *Kat3a*, *Kat3b* et *Kat13a* (Sugii and Evans, 2011). De la même façon, ces KATs sont des coactivateurs du MR (Yang and Young, 2009).

Troisièmement, des enzymes de la machinerie épigénétique comptent parmi les **messagers de cascades de signalisation intracellulaire classiques des récepteurs membranaires**. A titre d'exemple, certaines HDACs sont transloquées dans le noyau, en réponse à la signalisation cellulaire induite par le glucagon, afin d'induire une transcription des gènes de la néoglucogenèse (Mihaylova et al., 2011).

L'acétylation des histones serait sensible au statut nutritif de la cellule : le niveau total de H3ac est diminué dans les conditions hypoglycémiques (Donohoe and Bultman, 2012). L'équilibre entre l'activité des " *writers* " et des " *erasers* " de l'acétylation des histones serait ainsi affecté par la nutrition et le statut métabolique (Figure 23). Des altérations de l'acétylation des histones pourraient avoir des répercussions sur l'expression génique, au niveau pangénomique ou au niveau des séquences cibles.

Au cours de mon travail de thèse, comme vous pourrez le lire dans l'Article 1, j'ai pu constater un effet particulier de l'environnement métabolique sur la machinerie régulant l'acétylation des histones. Par conséquent, **dans cette introduction je vais focaliser l'attention sur les régulateurs de l'acétylation des histones dans le contexte de l'environnement métabolique et nutritionnel.**

Gene	Alias	Nom complet
Kat1	Hat1	K(lysine) acetyltransferase 1 / Histone AminoTransferase 1
Kat2a	Gcn5	K(lysine) acetyltransferase 2A / Lysine acetyl General Control Non-repressed Protein 5
Kat2b	PCAF	K(lysine) acetyltransferase 2B / P300/CBP-associated factor
Kat3a	CBP/ CREBbp	K(lysine) acetyltransferase 3A / CREB-binding protein (CREBBP)
Kat3b	p300 (EP300)	E1A binding protein p300
Kat4	TAF1	K(lysine) acetyltransferase 4 / TATA box binding protein (TBP)-associated factor
Kat5	TIP60	K(lysine) acetyltransferase 5
Kat6a	MYST3 / MOZ	K(lysine) acetyltransferase 6a
Kat6b	MORF/ MYST4/ querkopf	K(lysine) acetyltransferase 6b / MYST histone acetyltransferase monocytic leukemia 4
Kat7	MYST2 / HBO1	K(lysine) acetyltransferase 7
Kat8	MYST1 / MOF	K(lysine) acetyltransferase 8
Kat9	ELP3	K(lysine) acetyltransferase 9 / Elongator acetyltransferase complex subunit 3
Kat10		K(lysine) acetyltransferase 10
Kat11	Rtt109	K(lysine) acetyltransferase 11
Kat12	TFIIIC90	K(lysine) acetyltransferase 12
Kat13a	SRC1 / NCOA1	K(lysine) acetyltransferase 13a / Steroid Receptor Coactivator-1 / Nuclear receptor coactivator 1
Kat13b	SRC3 / NCOA3	K(lysine) acetyltransferase 13b / Steroid Receptor Coactivator-3 / Nuclear receptor coactivator 3
Kat13c	SRC2 / NCOA2	K(lysine) acetyltransferase 13c / Steroid Receptor Coactivator-2 / Nuclear receptor coactivator 2
Kat13d	Clock	K(lysine) acetyltransferase 13d / Circadian locomotor output cycles kaput

Tableau 4 : Les lysine acétyl-transférases (KAT)

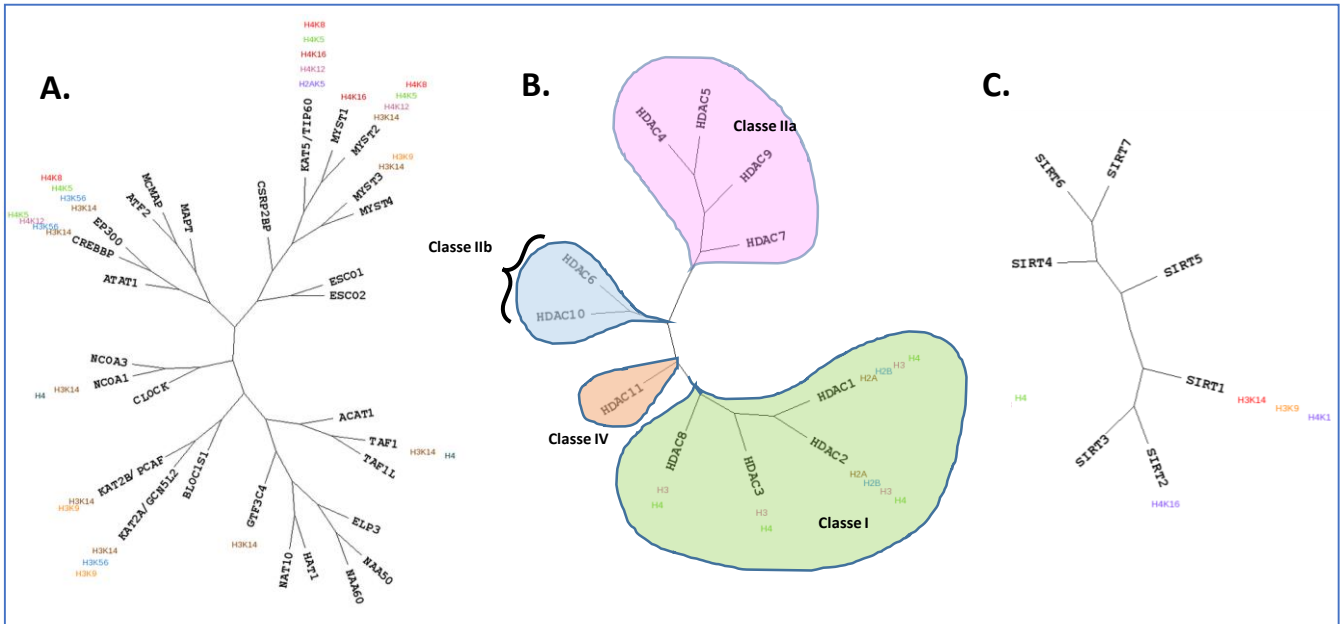


Figure 25. Arbres phylogénétiques des lysine acétyltransférases (A), KATs, et histone désacétylases, HDACs (B) et Sirtuins (C)

Ces arbres ont été générés sur le site ChromoHub (http://apps.thesgc.org/resources/phylogenetic_trees/) le 23/06/2015. Les substrats spécifiques sont indiqués en couleur pour chaque protéine (si connus).

Adapté de Liu et al., 2012

4) Acétylation des histones et métabolisme

4-1) Machinerie épigénétique impliquée dans la régulation de l'acétylation des histones

Deux familles régulent l'acétylation des histones : les KATs et les HDACs. Les KATs transfèrent le groupement acétyle -$COCH_3$, issu de l'Acetyl-CoA, sur les lysines des histones, tandis que les HDAC effectuent une réaction inverse (Figure 24) (Kim and Yang, 2011). Plusieurs sites sur les queues des histones peuvent être acétylés (Figure 16). **L'acétylation des histones serait associée à la chromatine ouverte et à la transcription active** (Seto and Yoshida, 2014). Cette réaction change la charge de la chromatine : les lysines sont chargées positivement, tandis que les lysines acétylées sont neutres. La neutralisation des charges positives affaiblit les interactions des histones avec l'ADN, chargé négativement, permettant ainsi une ouverture de la chromatine et son accessibilité à la machinerie de transcription génique (Roth et al., 2001).

4-1-1) "*Writers*" de l'acétylation des histones : lysines acétyltransférases (KAT)

Les membres de la famille des KATs sont présentés dans le Tableau 4. Ces enzymes possèdent un domaine d'activité acétyltransférase, capable de lier l'Acétyl-CoA et le substrat sur l'histone. Certaines possèdent également un bromodomaine, reconnaissant les lysines acétylées (par exemple KAT2a, KAT2b, KAT3b, KAT3a) (Roth et al., 2001). Il existe plusieurs sous-familles de KATs, selon l'homologie des séquences : Hat1, GNATs (Gcn5-related histoneN-acetyltransferases), Myst, p300/CBP, Kat11 et SRC (steroid receptor coactivators) (Marmorstein and Zhou, 2014). L'arbre phylogénétique de la famille des KATs, construit sur le site ChromoHub, est représenté sur la Figure 25A (Liu et al., 2012). L'action des différentes KATs, selon leur domaine enzymatique, est **spécifique du substrat** (lysine / histone) (Roth et al., 2001). L'existence de nombreux sites d'acétylation et de nombreuses KATs spécifiques permet une grande variété de réponses à un stimulus et une complexité de régulation de l'expression des gènes cibles. De plus, la plupart des KATs agissent au sein de complexes multiprotéiques, nécessaires à l'activation et à la spécificité de la réaction (Carrozza et al., 2003). La même enzyme au sein de différents complexes peut cibler différentes lysines.

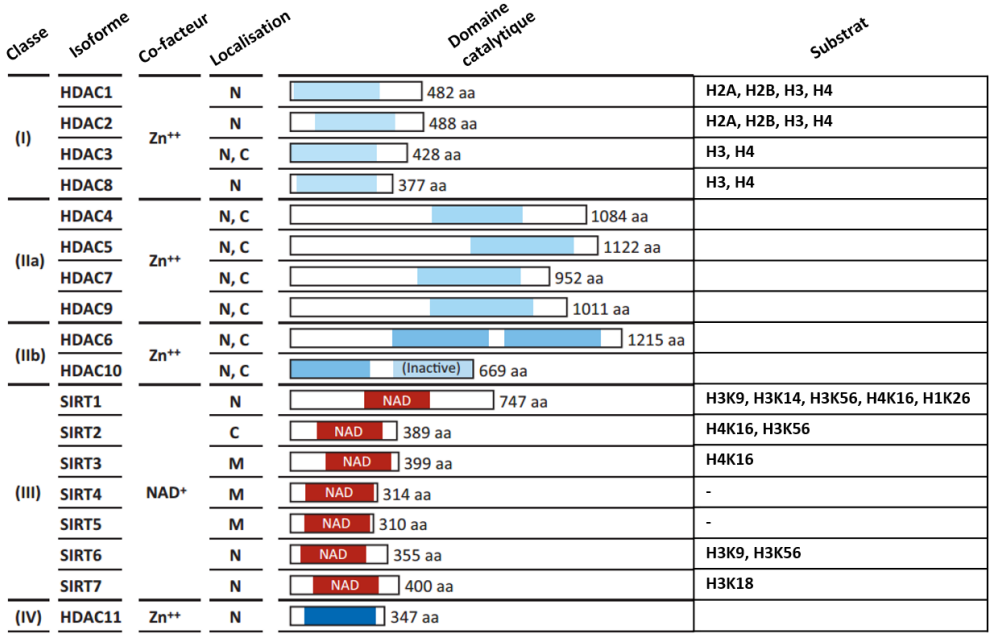


Figure 26. Classification, domaines catalytiques et substrats des histone désacétylases (HDAC et Sirtuines)

18 isoformes sont connues chez les mammifères, classées en 4 groupes. La structure et le nombre des acides aminés est indiqué pour chaque isoforme. Les domaines catalytiques sont indiqués en couleur: bleu – domaine désacétylase classique, rouge – domaine désacétylase NAD^+ dépendant.

Localisation cellulaire : N – noyau, C – cytoplasme, M – mitochondrie.

Adapté de Shirakawa et al., 2013; Seto et al., 2014

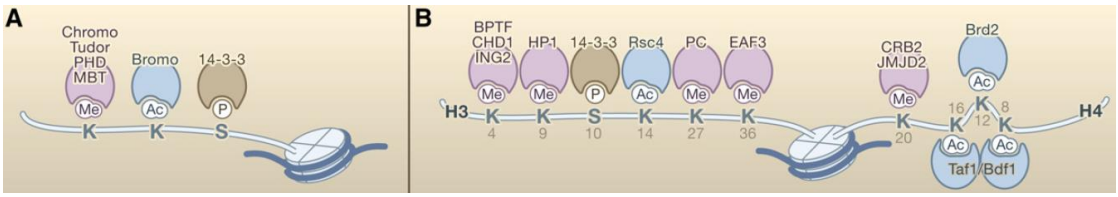


Figure 27. Domaines de reconnaissance des marques épigénétiques et recrutement des protéines aux histones

(A) Les protéines à bromodomaine (Bromo) reconnaissent l'acétylation des histones; les protéines de la famille 14-3-3 reconnaissent la phosphorylation. Le chromodomaine (Chromo), le domaine Tudor, le domaine PHD (Plant Homeodomain) et le domaine MBT (Malignant Brain Tumor) reconnaissent et se lient au groupement méthyle.

(B) Les protéines sont recrutées par les modifications au niveau des lysines (K) sur les histones. Par exemple, la protéine à bromodomaine 2 (BRD2) reconnait et se lie à la lysine acétylée en position 12 sur l'histone 4 (H4K12ac).

BPTF – bromodomain PHD finger transcription factor, CHD1 – chromodomain helicase DNA binding protein 1, ING2 – inhibitor of growth family, member 2, HP1 – heterochromatin protein 1, Rsc4 – chromatin structure-remodeling complex subunit RSC4, PC – polycomb protein, CRB2 – Crumbs Family Member 2, JMJD2 – jumonji C domain-containing histone demethylase 2, Taf1/Bdf1 – TATA Box Binding Protein (TBP)-Associated Factor / Bromodomain factor 1.

Adapté de Kouzarides et al., 2007

4-1-2) " *Erasers* " de l'acétylation des histones : lysines désacétylases (HDAC)

L'acétylation des histones est une réaction réversible. Dix-huit histone-désacétylases (HDAC), connues chez l'homme et les rongeurs, sont réparties en 2 familles et 4 classes (Figure 26) (Seto and Yoshida, 2014). L'hydrolyse de substrats acétylés par la **1ère famille, les HDAC**, est dépendante du Zn^{2+}. Cette famille est sous-divisée en 3 classes (I, II et IV), selon leur homologie structurale, leur structure protéique tridimensionnelle et leur ancêtre commun. Les enzymes de la **2ème famille, les sirtuines**, ont besoin de NAD^+ pour la réaction et ont une structure différente des HDAC (Li and Kazgan, 2011). L'arbre phylogénétique de ces deux familles de lysine désacétylases est représenté sur la Figure 25B et C (Liu et al., 2012). Il est à noter que les **HDAC sont moins spécifiques du substrat que les KATs** (Seto and Yoshida, 2014). Une certaine redondance fonctionnelle est également observée entre les différents membres de cette famille. De manière intéressante, les HDAC1, 2 et 3 possèdent une activité désacétylase faible, mais leur activité enzymatique est renforcée au sein d'un complexe multiprotéique. Les sirtuines effectuent la réaction sur des substrats spécifiques.

Quatre des 11 HDACs (HDAC1, 2, 8 and 11) ont une localisation nucléaire, alors que les 7 autres peuvent être transloquées entre le cytoplasme et le noyau. Parmi les sirtuines, 3 enzymes se trouvent dans la **mitochondrie** (SIRT3, 4 et 5), 1 est **cytoplasmique** (SIRT2) et 3 sont **nucléaires** (SIRT1, 6 et 7) (Figure 26) (Seto and Yoshida, 2014). Les KATs et HDAC peuvent réguler l'acétylation d'autres protéines que les histones, notamment les protéines impliquées dans le métabolisme (Guan and Xiong, 2011).

4-1-3) "*Readers*" de l'acétylation des histones : protéines à bromodomaine

Les marques d'acétylation des histones peuvent être "lues" par les protéines à bromodomaine (Figure 27). Ce bromodomaine, composé de 110 acides aminés, possède des motifs conservés qui reconnaissent la lysine monoacétylée. Cette **liaison est spécifique de la position de la lysine sur l'histone**, car le bromodomaine reconnait les acides aminés qui entourent la lysine acétylée (Marmorstein and Zhou, 2014).

Chez l'homme, 46 protéines possèdent un ou plusieurs bromodomaines : certaines KATs (KAT2a, KAT2b, KAT3a, KAT3b et KAT4) et HMTs (KMT2a, KMT2b), les co-activateurs

	Protein	Organism	Acetyl-histone-binding
Lysine acétyltransférases	Gcn5 (Kat2a)	human	K5 acetylated-H2A
			K8 acetylated-H4
			K16 acetylated-H4
	PCAF (Kat2b)	human	acetylated-H3
			acetylated-H4
	$TAF_{II}250$ (Kat4)	human	K16 acetylated-H4
			K8/K16 acetylated-H4
			K5/K12 acetylated-H4
			K5/K8/K12/K16 acetylated-H4
			K14 acetylated-H3
			K8 acetylated-H4
			K12 acetylated-H4
			K16 acetylated-H4
Protéines de la famille BET	Brd2	mouse	K5 acetylated-H2B
			K12 acetylated-H2B
			K8 acetylated-H4
			K12 acetylated-H4
			K16 acetylated-H4
	Brd4	mouse	K14 acetylated-H3
			K9/K14 acetylated-H3
			K5/K12 acetylated-H4
			K5/K8/K12/K16 acetylated-H4
	BRDT	mouse	acetylated-H4

Tableau 5. Modifications cibles des protéines à bromodomaines chez l'homme et la souris

K – lysine, H – histone, BET - bromodomain and extraterminal domain.

Adapté de Kimura et al., 2005

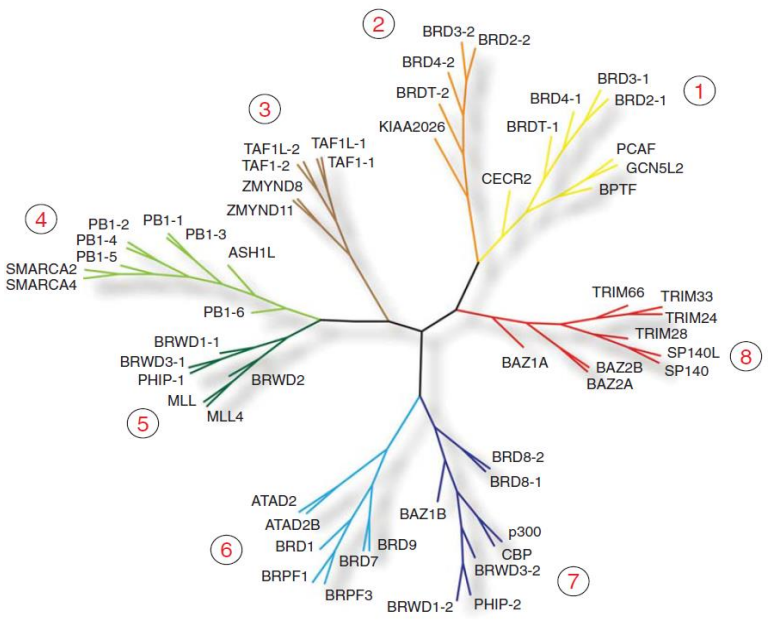


Figure 28. Arbre phylogénétique des 8 familles de protéines à bromodomaine chez l'homme

Adapté de Marmorstein and Zhou, 2014

transcriptionnels ou les protéines des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants (Filippakopoulos and Knapp, 2014; Marmorstein and Zhou, 2014) (Figure 28). Plus particulièrement, les membres de la **famille BET** (bromodomain and extraterminal domain) contiennent 2 bromodomaines.

Les marques épigénétiques reconnues par les protéines à bromodomaine sont représentées dans le Tableau 5. Ainsi, l'acétylation des histones servirait de plate-forme pour les protéines à bromodomaine, qui **recrutent des complexes multiprotéiques** au niveau de la chromatine acétylée, ou possèdent une activité acétyltransférase. Ces complexes, contenant des ATPases ou KATs, participeraient au **remodelage de la chromatine** ou à l'acétylation ultérieure, menant à une transcription active (Kimura, 2005).

4-2) L'implication des régulateurs de l'acétylation des histones dans le métabolisme et les pathologies métaboliques

4-2-1) Les lysines acétyltransférases

Plusieurs études ont démontré un lien entre les KATs et le métabolisme énergétique ou l'obésité. L'acétyltransférase **Kat2a** est une composante principale du complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase) (Carrozza et al., 2003). Très proche sur les plans structurel et fonctionnel de Kat2a, la **Kat2b** forme le complexe PCAF (P300/CBP-associated factor). Ces deux enzymes sont impliquées dans la **différenciation des adipocytes bruns** à partir des fibroblastes (Jin et al., 2014) (Tableau II, Annexes). Une surexpression de Kat2a chez la souris diminue la production du glucose par le foie, ainsi que la glycémie à jeun (Lerin et al., 2006) (Tableau II, Annexes). La Kat2a contrôle l'activité de Pgc1α (peroxisome proliferative activated receptor gamma, coactivator 1 α), régulateur du **métabolisme glucidique** hépatique, via l'acétylation de cette protéine. Pgc1α acétylé est fonctionnellement inactif (Lerin, 2006). L'expression de *Pepck* et *G6P*, gènes cibles de Pgc1α, en réponse au jeûne, est ainsi inhibée dans le foie de ces animaux. L'acétylation des protéines non-histones serait ainsi un moyen non-négligeable de régulation du métabolisme (Guan and Xiong, 2011).

La mutation du gène ***Kat3a***, qui provoque un recrutement accru de Kat3a, induit un **phénotype diabétique** chez la souris : insulinorésistance, hyperglycémie à jeun, intolérance au glucose, hyperinsulinémie, perturbations de la sécrétion de l'insuline (Zhou et al., 2004) (Tableau II, Annexes). Chez les animaux mutés mono- et hétérozygotes, une activation de la

néoglucogenèse hépatique est observée à l'état nourri. La surexpression de *Kat3b* provoque une stéatose hépatique, une insulinorésistance, une intolérance au glucose et une augmentation des triglycérides plasmatiques chez la souris (Bricambert et al., 2010). Ce phénotype est associé à une hyperacétylation de H3K9 et une augmentation de l'expression des gènes de la **lipogenèse** et de la néoglucogenèse.

Dans une étude sur les cellules 3T3, les conditions hyperglycémiques et hyperinsulinémiques provoquent une diminution de l'expression de ***Kat6b*** (Tableau II, Annexes) (Gupta et al., 2012). De manière intéressante, la régulation épigénétique permet une répression de ce gène : le niveau des marques activatrices (H3ac, H3K4me1) est diminué, tandis que celui d'une marque répressive, H3K9me1, est augmenté.

Les acétyltransférases ***Kat13a***, ***Kat13b*** et ***Kat13c*** jouent un rôle dans la régulation de la balance énergétique (Tableau II, Annexes). Les souris invalidées pour ces gènes sont résistantes à l'obésité sous le régime HFD, en raison d'un niveau de **dépense énergétique** élevé (Coste et al., 2008; Picard et al., 2002; Wang et al., 2006).

L'acétylation de la chromatine contribue à la **régulation circadienne du métabolisme**. L'invalidation de l'acétyltransférase ***Kat13d*** **(Clock**, Circadian locomotor output cycles kaput), régulateur des rythmes circadiens, provoque des perturbations des rythmes de la consommation alimentaire, une obésité sévère et un diabète chez la souris (Turek, 2005). Chez l'homme, certains polymorphismes du gène *Kat13d* sont associés à l'obésité (Garaulet et al., 2010; Sookoian et al., 2008).

Ces résultats prouvent que **les membres de la famille des KAT pourraient contribuer à l'étiopathologie de l'obésité et du diabète**.

4-2-2) Les lysines désacétylases

Les lysines désacétylases contrôlent l'adipogenèse. Par exemple, la **HDAC1** et **HDAC9** sont des régulateurs négatifs de la **différenciation des préadipocytes** (Chatterjee et al., 2011; Yoo et al., 2006) (Tableau II, Annexes). Cet effet est médié par une répression transcriptionnelle des gènes adipogéniques, tels qu'*Adiponectine*, *Srebp1c*, *Cebpα* et *Pparγ*. Au cours de la différenciation, le niveau de l'acétylation, total ou sur les promoteurs des gènes adipogéniques, augmente, tandis que l'activité de la désacétylation et l'expression de certaines *HDAC* diminuent. Par exemple, Hdac9, au sein d'un complexe protéique, réprime l'expression de *Cebpα* dans les préadipocytes, les maintenant ainsi dans un état non-différencié. Au cours de la

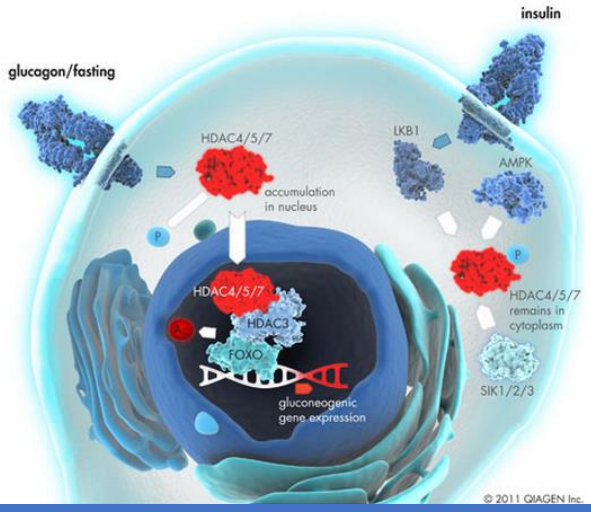


Figure 29. Régulation du métabolisme glucidique par les histone désacétylases (HDAC) de classe II

Abréviations: FOXO – Forkhead box protein O, AMPK – AMP-activated protein kinase, LKB1 – liver kinase B1, SIK – Salt-Inducible Kinase

Adapté de Mihaylova et al., 2011;

site *http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/minireview/mtablic.php*

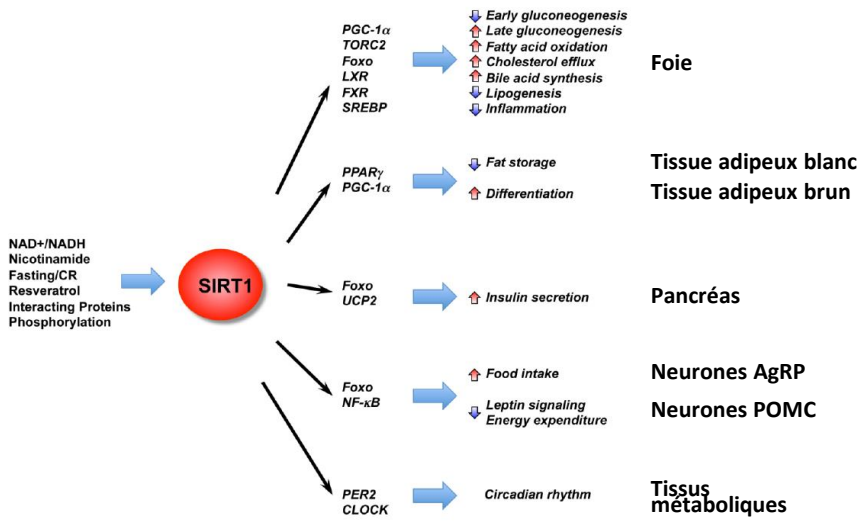


Figure 30. Fonctions de SIRT1 dans le métabolisme énergétique

L'activité de la Sirtuine 1 dépend de statut énergétique de la cellule et des protéines régulatrices avec lesquelles elle interagit. SIRT1 régule diverses fonctions métaboliques dans de nombreux organes via la désacétylation des histones ou des protéines non-histones.

Adapté de Li et al., 2011

différenciation, Hdac9 est remplacée par *Kat3b*, permettant la transcription de ce gène. Ainsi, au cours de l'adipogenèse, le switch entre les "*writers*" et "*erasers*" de l'acétylation des histones a lieu (Chatterjee et al., 2011).

La **HDAC5** est un régulateur négatif de l'expression de GLUT4, récepteur de glucose insulino-dépendant, dans le muscle (McGee et al., 2008) (Tableau II, Annexes).

Les **HDACs de classe II** sont des régulateurs du métabolisme glucidique dans le foie (Mihaylova et al., 2011) (Figure 29). A l'état nourri, sous l'action de l'insuline, ces HDACs sont phosphorilés par l'AMPK, ce qui les retient dans le cytoplasme. Après le jeûne, sous l'action du glucagon, les **Hdac4, 5 et 7** sont déphosphorylés et transloqués dans le noyau. Ensuite, la **Hdac3** est recrutée, ce qui permet une désacétylation du facteur de transcription FOXO, ce qui provoque son activation et la transcription des gènes de la **néoglucogenèse**. L'invalidation des Hdac4, 5 et 7 inhibe les gènes cibles de FOXO et augmente le stockage du glycogène.

De manière intéressante, la nutrition altère l'expression des Hdacs dans l'hypothalamus chez la souris (Funato et al., 2011). Ces enzymes sont **sensibles au régime HFD et au jeûne** prolongé. Les membres de cette famille réagissent différemment à l'environnement nutritionnel. La fonction respective de ces enzymes reste encore à explorer.

Chez le rat, le **régime hyperlipidique maternel peut conditionner le niveau de l'acétylation chez la descendance** : le niveau de H4ac est diminué dans la glande mammaire de la progéniture (Zheng et al., 2012). Le recrutement de **Hdac3** au niveau du promoteur de $p16^{INK4a}$, suppresseur des tumeurs, est diminué. Ce phénomène pourrait être à l'origine de la diminution de l'expression de ce gène.

Les **sirtuines** sont certainement des **régulateurs importants du métabolisme énergétique** et représentent un lien entre le signal nutritionnel/énergétique et les processus métaboliques, grâce à leur dépendance au rapport NAD^+/NADH (Li and Kazgan, 2011; Yu and Auwerx, 2009). Plusieurs études attestent du rôle de **Sirt1**, membre le plus étudié de cette famille, dans plusieurs aspects du métabolisme énergétique (Tableau II, Annexes) (Figure 30). Au cours du jeûne, SIRT1 désacétyle le Pgc1α qui devient actif et augmente la production de glucose hépatique (Rodgers et al., 2008). Une hypoglycémie, une meilleure tolérance au glucose et à l'insuline, ainsi que le niveaux élevé des acides gras et du cholestérol hépatiques sont observées chez les souris invalidées pour *Sirt1* (Rodgers and Puigserver, 2007). L'expression des gènes de la néoglucogenèse, de la glycolyse, de transport du cholestérol et du métabolisme des acides gras est altérée chez ces animaux. **Hormis le métabolisme glucidique**

et lipidique, SIRT1 est également impliquée dans la sécrétion de l'insuline, de l'adipogenèse et de la régulation circadienne du métabolisme (Li and Kazgan, 2011; Purushotham et al., 2009).

De manière intéressante, l'expression de ***SIRT1*** et ***SIRT2*** est augmentée après 8 semaines de **régime hypocalorique** (restriction de 30% en termes de calories) dans les cellules mononuclées du sang des patients obèses (Crujeiras et al., 2008). Chez ces patients, qui ont perdu 5,8% du poids en moyenne, l'expression de ces sirtuines est associée à une expression de certains gènes de la chaine respiratoire mitochondriale. Par ailleurs, l'expression de *Sirt2* diminue progressivement au cours de la **différenciation adipocytaire** ; l'invalidation de ce gène favorise l'adipogenèse, tandis que la surexpression l'abolit (Jing et al., 2007).

Les sirtuines, localisées dans la mitochondrie, régulent l'acétylation des protéines mitochondriales et jouent un rôle important dans les pathologies métaboliques. Le régime HFD induit une diminution de l'expression de ***Sirt3*** dans le foie murin et une hyperacétylation des protéines mitochondriales (Hirschey et al., 2011) (Tableau II, Annexes). Un polymorphisme nucléotidique (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) dans le gène de *SIRT3* chez l'homme ou l'invalidation de ce gène chez la souris sont associées à un **syndrome métabolique**. La **sirtuine 4** serait un régulateur négatif de la **sécrétion de l'insuline** par les cellules β pancréatiques, car le niveau de l'insuline plasmatique dans un état nourri et à jeun est augmenté chez les souris invalidées pour ce gène (Haigis et al., 2006). L'inactivation de *Sirt4* augmente l'expression des gènes d'**oxydation lipidique** dans le foie, ainsi qu'une oxydation des acides gras et une respiration cellulaire dans des myotubes primaires (Nasrin et al., 2010). Par ailleurs, l'expression de *Sirt4* est augmentée dans 3 modèles distincts de **diabète** chez la souris. De manière intéressante, le niveau plasmatique de SIRT4 est diminué chez les **patients obèses** (IMC > 35.6 kg/m^2), par rapport aux sujets non-obèses (Savastano et al., 2015).

L'invalidation de ***Sirt6*** exclusivement dans les neurones provoque une hyperacétylation au niveau de H3K9 et H3K56 dans plusieurs zones cérébrales, ce qui est associé à une **obésité** sévère à l'âge adulte (Schwer et al., 2010) (Tableau II, Annexes). De plus, le niveau protéique de SIRT6 est **modulé par une restriction calorique** (Kanfi et al., 2008). Les souris invalidées pour ***Sirt7*** sont, au contraire, résistantes au développement de l'obésité, de la stéatose hépatique et de l'intolérance au glucose sous régime HFD (Tableau II, Annexes) (Yoshizawa et al., 2014). Dans un environnement obésogène, l'expression des gènes, impliqués dans le transport des acides gras et la synthèse des lipides, est diminuée chez ces souris.

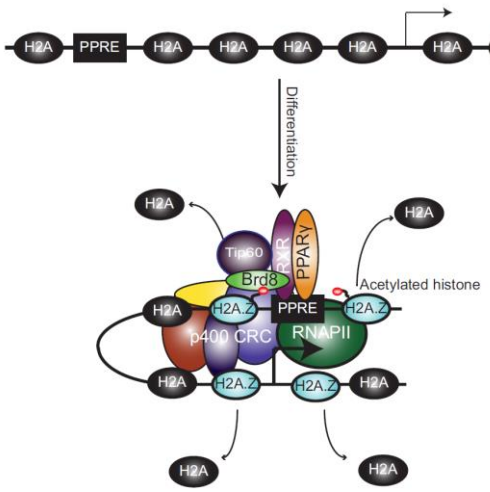


Figure 31. Complexe BRD8 / p400 / PPARγ / RXR qui régule l'expression des gènes cibles de PPARγ au cours de la différenciation des adipocytes chez la souris

BRD8 se lie aux lysines acétylées grâce à son bromodomaine. Cela permet le recrutement d'un hétérodimère PPARγ / RXRα aux séquences PPRE (peroxisome proliferator response element), ainsi que d'autres acteurs de ce complexe multiprotéique. L'acétylation des histones est médiée par la lysine acétyltransférase TIP60 (KAT5). Les histones H2A sont remplacées par les H2A.Z et la polymérase II (RNAPII) est recrutée par p400 au niveau des gènes cibles de PPARγ, permettant la transcription et la différenciation des 3T3-L1 adipocytes.

Adapté de Couture et al., 2012

L'ensemble de ces résultats indique **l'implication des 7 membres de la famille des sirtuines dans le métabolisme glucidique et lipidique**. Une sensibilité à la restriction calorique ou à la surnutrition est démontrée pour une partie de ces protéines. Les données chez la souris, ainsi que chez les patients obèses, laissent supposer que les sirtuines contribueraient au développement du syndrome métabolique.

Une perturbation de l'équilibre entre les lysine désacétylases et acétyltransférases pourrait affecter de nombreuses fonctions : le développement du tissu adipeux, le métabolisme du glucose, les rythmes circadiens ou encore le métabolisme énergétique.

4-2-3) Les protéines à bromodomaine

Certains membres de la famille BET sont impliqués dans le phénotype de **l'obésité** (Wang et al., 2013) (Tableau II, Annexes). L'invalidation de ***Brd2***, létale chez les homozygotes, provoque une obésité sévère chez la souris, accompagnée d'une hyperphagie, d'une **stéatose hépatique**, d'une **hyperinsulinémie** et d'un niveau sanguin de cytokines élevé (Wang et al., 2010). De manière surprenante, un nombre plus élevé de cellules β pancréatiques, une meilleure tolérance au glucose et une glycémie à jeun plus basse permettent d'éviter le diabète à ces animaux. Cette amélioration du métabolisme glucidique est probablement liée à une production de chaleur élevée, ainsi qu'à une **expansion excessive de tissu adipeux brun**. Brd2 est un régulateur négatif de la **différenciation des adipocytes**, via la répression transcriptionnelle de son gène cible, *Pparγ* (Wang et al., 2010). **Brd8**, au contraire, est nécessaire pour l'expression de *Pparγ* (Couture et al., 2012). Il fait partie d'un complexe multiprotéique, contenant BRD8, PPARγ, Kat5 et p400, une ATPase nécessaire pour le remodelage de la chromatine (Figure 31).

Selon les données présentées dans cette sous-partie, la machinerie de l'acétylation des histones est fortement impliquée dans le métabolisme énergétique.

5) Implication des mécanismes épigénétiques dans le concept de la DOHaD

L'établissement des marques épigénétiques, comme nous venons de le voir, est très dynamique au cours du développement. Le remodelage de l'épigénome et sa dynamique sont très importants pour la différenciation correcte des cellules et leur organisation en tissus. Par ailleurs, la machinerie épigénétique, qui contrôle ce processus, est sensible à l'environnement. Les altérations épigénétiques pourraient ainsi être un des mécanismes de conditionnement au cours du développement précoce. En effet, des études récentes, chez les animaux de laboratoire et chez l'homme, démontrent que **des facteurs environnementaux, intervenus au cours du développement précoce, pouvaient perturber les processus épigénétiques** (Attig et al., 2010; Gabory et al., 2011), entrainant des effets à long terme sur la santé de l'individu, longtemps après la disparition du facteur initiateur. Par conséquent, **l'épigénétique est un des mécanismes qui relie les événements subis lors du développement à l'apparition de maladies chroniques à l'âge adulte** (Portha et al., 2014). Les promoteurs de certains gènes, impliqués dans l'obésité, le métabolisme, le stress ou le développement, sont connus pour être des cibles de la régulation épigénétique dans le contexte de la DOHaD. Les études les plus marquantes concernent le récepteur aux glucocorticoïdes, les peptides qui sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire, et certains facteurs de transcription, nécessaires pour le développement des organes.

5-1) Régulation épigénétique du récepteur aux glucocorticoïdes et DOHaD

Une série d'études chez l'animal a mis en évidence que l'expression du récepteur des glucocorticoïdes (GR, glucocorticoid receptor) pouvait être conditionnée par le comportement ou la nutrition de la mère. Ce récepteur nucléaire, liant les stéroïdes, est impliqué dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique. Chez l'homme, le glucocorticoïde prédominant est le cortisol, tandis que, chez les rongeurs, c'est la corticostérone. La liaison du ligand avec le récepteur induit une translocation du GR dans le noyau et une fixation sur des séquences spécifiques GRE (glucocorticoid response elements), afin de réguler la transcription des gènes. Des perturbations dans la signalisation des stéroïdes au niveau des tissus métaboliques peuvent contribuer à l'apparition du syndrome métabolique (Patel et al., 2014).

Chez le rat, le comportement maternel au cours de la lactation (position d'allaitement arquée et toilettage fréquent des ratons) conditionne la réponse au stress des descendants et l'expression du *GR* dans leur hippocampe à l'âge adulte (Liu et al., 1997) (Tableau III, Annexes). Chez les descendants des femelles au comportement maternel moins prononcé, une hyperméthylation est observée pour certains CpG du promoteur du *GR*, par rapport à ceux des femelles ayant un comportement normal (Weaver et al., 2004). De plus, le niveau d'acétylation de H3K9, marque activatrice, est diminué au niveau de ce promoteur. Par la suite, les auteurs ont voulu tester si ces effets épigénétiques étaient réversibles. Des injections intracérébrales de trichostatine A (TSA), un inhibiteur des HDAC, a permis de restaurer le niveau de H3K9ac et, de manière intéressante, le niveau du GR dans l'hippocampe, ainsi que celui de la sécrétion du corticostérone suite au stress (Weaver et al., 2004). Ces résultats montrent que **le comportement maternel, en période post-natale précoce, peut conditionner la réponse aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe chez les descendants, avec des répercussions sur la réponse au stress dans la vie adulte.**

La nutrition maternelle aurait également un effet à long terme sur l'expression et la régulation épigénétique du *GR* chez la descendance. Le régime HFD maternel provoque une diminution de l'expression du *GR* dans l'hippocampe et du comportement anxieux chez la descendance (Sasaki et al., 2014) (Tableau III, Annexes). Chez le rat, un régime pauvre en protéines, pendant la gestation, altère les marques épigénétiques au niveau du promoteur du *GR*, ce qui est lié à une augmentation de l'expression de ce gène dans le foie des descendants adultes (Lillycrop et al., 2007). Chez la brebis, la sous-nutrition en période périconceptionnelle, accompagnée d'une perte de poids de l'ordre de 10-15%, entraine une augmentation de l'expression du *GR* dans l'hypothalamus des descendants adultes (Begum et al., 2013). Des altérations épigénétiques observées au niveau du promoteur du *GR* sont concordantes avec cette activation transcriptionnelle : une diminution des marques "répressives" (méthylation de l'ADN et H3K27me3), et une augmentation d'une marque "activatrice" (H3K9ac).

Chez l'homme, peu de travaux fournissent les preuves de l'impact de l'environnement maternel sur la régulation épigénétique du gène *GR*. **La dépression de la mère serait associée à la méthylation de son promoteur dans le cordon ombilical et le placenta, ainsi qu'à la réponse au stress et au comportement neurologique chez le nourrisson** (Conradt et al., 2013; Oberlander et al., 2008).

L'ensemble de ces travaux suggère que **les marques épigénétiques au niveau du *GR* sont sensibles à la physiologie de la mère**. La méthylation de l'ADN et les modifications des

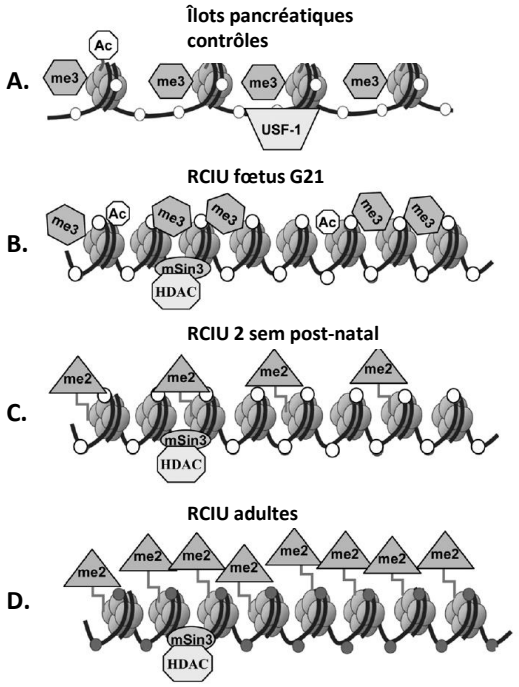


Figure 32. Altérations épigénétiques progressives au niveau du promoteur de *Pdx1* dans les cellules β pancréatiques des rats, ayant subi un RCIU, durant l'installation du diabète de type 2

(A) Dans les îlots des rats des mères contrôles: le promoteur de *Pdx1* est non-méthylé (ronds blancs) et la chromatine est dans un état ouvert (H3ac, H4ac, H3K4me3 (hexagones)). Cette signature épigénétique permet la fixation de facteurs de transcription, comme USF1.

(B, C) Chez les fœtus et les souriceaux à l'âge de 2 semaines, le retard de croissance provoque une perte progressive de l'acétylation et un recrutement d'un complexe répressif HDAC/mSin3. Le niveau de la marque H3K9me2 (triangles) augmente après la naissance, alors que celui de H3K4me3 diminue.

(D) Chez l'adulte, une signature épigénétique répressive est observée: la méthylation de l'ADN (ronds gris) et l'enrichissement de H3K9me2 répriment la transcription de *Pdx1*.

G – jour gestationnel; RCIU – retard de croissance intra-utérin; sem – semaine, USF1 – Upstream Transcription Factor 1, Ac – acétylation, me2 – diméthylation, me3 – triméthylation, ac – acétylation, H – histone.

Adapté de Park et al., 2008

histones agissent ensemble pour conditionner l'expression de ce gène à long terme. De manière intéressante, ces effets seraient réversibles (Weaver et al., 2004).

5-2) Altérations épigénétiques et le conditionnement du diabète

La restriction de croissance fœtale, provoquée par une diminution de l'apport sanguin au fœtus par une ligature des artères utérines, prédispose les rats au diabète de type 2. Des altérations épigénétiques progressives au niveau du promoteur de *Pdx1* (pancreatic and duodenal homeobox 1) sont mises en évidence dans les **cellules β du pancréas** des descendants (Park et al., 2008). Ce facteur de transcription est crucial pour le développement du pancréas et pour la différenciation des cellules β. Au stade fœtal, et par la suite, à 2 semaines et à l'âge de 6 mois, l'acétylation des histones 3 et 4 est progressivement abolie. Ceci est en accord avec l'enrichissement du promoteur de *Pdx1* avec une désacétylase Hdac1. A l'âge adulte, le niveau d'une marque activatrice, H3K4me3, est également diminué, tandis que celui de la marque répressive H3K9me2 est augmenté. En parallèle, une liaison accrue des ADN méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3a à ce promoteur est observée, de façon concordante avec une hyperméthylation. **Cette signature épigénétique de type répressif est associée à une répression transcriptionnelle de *Pdx1*, qui progresse au cours du développement** (Figure 32). Cette étude marquante, prenant en compte à la fois la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et les modificateurs épigénétiques responsables de ces marques, permet de mieux comprendre les origines de la prédisposition au diabète de type 2 chez les rats présentant un retard de croissance.

Une autre étude montre une hyperméthylation au niveau d'*Irs1* et de *Glut4*, associée à une diminution de leur expression dans le muscle. Ces rats sont prédisposés au diabète et à l'obésité (Tableau III, Annexes) (Liu et al., 2013). **Les altérations des marques épigénétiques, au niveau des gènes impliqués dans le fonctionnement des cellules β pancréatiques ou dans l'action de l'insuline dans les tissus insulinodépendants, pourrait ainsi prédisposer au diabète les individus exposés à un environnement délétère au cours du développement précoce.**

5-3) Altérations épigénétiques des régulateurs de l'appétit et DOHaD

L'environnement maternel conditionnerait la **balance énergétique** de la progéniture, via l'impact sur l'expression de la **leptine** à l'âge adulte, grâce à des altérations de la **méthylation de son promoteur**. L'impact à long terme de la sous-nutrition maternelle sévère est établie dans une cohorte d'enfants exposées à la famine *in utero* durant l'hiver 1944-45 en Hollande (Tobi et al., 2009) (Tableau III, Annexes). A l'âge d'environ 60 ans, une hyperméthylation de *Lep* (leptine) est observée dans le sang chez les personnes dont la mère a subi la famine. **L'effet épigénétique de cette sévère sous-nutrition maternelle persiste ainsi avec l'âge.** Malheureusement, ni le niveau de l'expression de la leptine, ni le profil métabolique de ces sujets ne sont présentés dans cette étude.

Chez la souris, au contraire, le **régime pauvre en protéines** chez la mère provoque une hypométhylation de nombreux CpG dans le promoteur de la *Lep*, dans le TAB de la descendance adulte (Jousse et al., 2011) (Tableau III, Annexes). De manière intéressante, il n'y a pas d'altération de la méthylation de l'ADN au niveau global. Dans cette étude, l'expression du transcrit de la *Lep*, ainsi que le niveau protéique circulant de la leptine à jeun sont diminués. L'hypométhylation de son promoteur ne provoque donc pas d'activation transcriptionnelle dans le TAB à jeun. Toutefois, l'induction de la leptine pendant 5 heures suivantes la nuit à jeun est plus prononcée que chez les animaux contrôles. Une possibilité de répondre à jeun est ainsi altérée chez la descendance par la sous-nutrition maternelle.

La **surnutrition** au cours du développement précoce peut conditionner l'expression de *Pomc*, un neuropeptide cible de la leptine dans l'hypothalamus, chez les descendants, grâce à l'altération de la méthylation de l'ADN. *Pomc* est un précurseur de l'hormone α-MSH (α-melanocyte-stimulating hormone) à l'action anorexigène. Dans un modèle de surnutrition néonatale, certains CpG dans le promoteur de *Pomc*, situés au niveau des séquences de liaison des facteurs de transcription, sont hyperméthylés dans l'hypothalamus des ratons issus de petites portées (Plagemann et al., 2009) (Tableau III, Annexes). Malgré le niveau élevé de leptine, ni l'expression de *Pomc*, ni son niveau protéique ne sont augmentés, supposant une résistance à la leptine au niveau du SNC. Ce blocage de la réponse à la leptine serait à l'origine du développement d'une obésité au sevrage chez ces animaux. **Les altérations de la méthylation de la *leptine* sont ainsi observées dans les cas d'environnement nutritionnel précoce, riche ou pauvre.**

De manière intéressante, il existe une association entre le niveau de méthylation de *Pomc* et de *Npy*, dans les leucocytes des patients obèses, et le risque de reprendre du poids après l'arrêt du régime (Crujeiras et al., 2013). Ces résultats pourraient aboutir au développement des **marqueurs épigénétiques pour évaluer l'efficacité des interventions nutritionnelles** dans le traitement de l'obésité.

Selon ces études, le système de régulation de l'apport énergétique est affecté par l'environnement nutritionnel précoce, ce qui peut mener à une prédisposition accrue à l'obésité.

5-4) Altérations épigénétiques des facteurs de transcription impliqués dans le développement des tissus métaboliques

Chez le rat, le **régime pauvre en protéines** pendant la gestation provoque une hypométhylation des CpG spécifiques au niveau du promoteur de ***Pparα*** dans le foie de la descendance adulte (Lillycrop et al., 2008). Une supplémentation en acide folique de ces mères rétablit le niveau de méthylation. Une relation négative est observée entre le niveau de méthylation de 2 CpG et l'expression du transcrit de *Pparα*. De manière intéressante, l'effet de la malnutrition maternelle sur la méthylation des promoteurs de *Pparα* et de *GR* persiste dans la deuxième génération (Burdge et al., 2007). Ainsi, des altérations de la méthylation de l'ADN induits par le régime maternel ont un impact sur la transcription ; ces effets sont de plus transmissibles.

Un autre gène métabolique étudié dans le contexte de la DOHaD est le ***Cebpβ*** (CCAAT/enhancer-binding protein β), régulateur important du métabolisme lipidique et glucidique, ainsi que de la différenciation des muscles et des TAB (Marchildon et al., 2012; van der Krieken et al., 2015). L'hyperacétylation des histones 3 et 4, au niveau du promoteur de ce gène, est observée chez les descendants des rates nourries avec un régime pauvre en protéines au cours de la gestation (Zheng et al., 2011) (Tableau III, Annexes). Cette hyperacétylation est en accord avec une augmentation de l'expression de *Cebpβ*, ainsi que de son niveau protéique. De manière intéressante, ces effets de la sous-nutrition *in utero* sont spécifiques du tissu et du sexe : le muscle des femelles est touché, mais ni le TAB ni le foie, et aucun effet n'est observé chez les mâles.

L'obésité maternelle affecte également la **différenciation du TAB**, ainsi que son **transcriptome** et son **méthylome** chez la descendance adulte (Borengasser et al., 2013) . Chez

les descendants des mères obèses, l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse est augmentée dans le tissus adipeux péri-gonadique et rétro-péritonéal. Les 356 CpG différentiellement méthylés (sur 2,4 millions de CpG étudiés) sont mis en évidence chez ces animaux. De manière intéressante, ces altérations de la méthylation de l'ADN se situent principalement au niveau des régions flanquantes des îlots CpG, appelées "CGI shores", et à proximité des promoteurs de gènes importants pour le développement. Plus particulièrement, les CGI *shores*, en amont des gènes de *Cebpβ* et de ***Pparγ***, sont hypométhylés, en accord avec une augmentation du niveau protéique de ces régulateurs de l'adipogenèse (Tableau III, Annexes). En effet, la différenciation des adipocytes est plus prononcée chez ces animaux. D'après ces études, **la nutrition maternelle conditionnerait l'expression des facteurs de transcription (*Cebpβ, Pparα, Pparγ, Pgc1α*...) dans les tissus métaboliques, via l'altération des marques épigénétiques** (méthylation de l'ADN, modification des histones).

5-5) L'acétylation des histones, une restriction de croissance fœtale et le conditionnement du phénotype adulte

Pour illustrer les implications possibles de l'acétylation des histones dans le concept de la DOHaD, citons quelques travaux sur les modèles animaux, qui explorent les effets à long terme d'une croissance fœtale perturbée. La ligature des artères utérines chez le rat, au jour 19 de gestation, provoque une insuffisance utéro-placentaire, suivie d'**une restriction de croissance fœtale** (MacLennan, 2004). Des altérations épigénétiques chez la descendance sont observées : une **hyperacétylation** de l'histone 3 dans le foie aux jours postnataux 0 et 21. Le génome hépatique est hypométhylé, de façon concordante avec une diminution de l'expression de *Dnmt1* au 1er jour après la naissance. Une autre étude démontre que l'effet de restriction de croissance fœtale est **spécifique du résidu** : l'acétylation de H3K9, H3K14 et H3K18 est augmentée dans le foie de la descendance à la naissance. Ceci est en accord avec une diminution du niveau protéique de **Hdac1**, ainsi que de son activité enzymatique (Fu, 2004). De manière intéressante, un dimorphisme sexuel est observé : ces 3 marques sont toujours augmentées chez les mâles au jour postnatal 21, tandis que H3K9ac et H3K18ac sont, au contraire, diminuées chez les femelles. **L'environnement *in utero* provoque ainsi une réponse différente selon le sexe du descendant.** De plus, le promoteur de *Pgc1a* (PPARγ coactivator 1α) est enrichi avec la marque H3K9ac (Tableau III, Annexes). L'effet sur l'expression de ce facteur de transcription, important pour le métabolisme énergétique, ainsi que sur le phénotype de ces animaux, reste à déterminer.

La **sous-nutrition de la mère**, au cours de la 2ème moitié de la gestation et pendant la lactation, provoque une restriction de croissance à la naissance. A l'âge adulte, des altérations de l'acétylation des histones au niveau du promoteur du transporteur du glucose *Glut4* sont observées dans le muscle squelettique : une diminution de H3ac et de H3K14ac (Tableau III, Annexes) (Raychaudhuri et al., 2008). Quant aux enzymes de la machinerie épigénétique, les désacétylases **Hdac1** et **Hdac4** sont recrutées vers le promoteur de *Glut4*. De manière intéressante, cette désacétylation de l'H3 est associée à une diminution de l'expression de *Glut4*, uniquement chez les descendantes femelles. De plus, le niveau de H3K9me2 est augmenté, ainsi que celui de la méthyltransférase *Kmt1a* (*Suv39h1*, suppressor of variegation 3-9 homolog 1), qui est spécifique de cette marque "répressive".

Selon ces résultats, **l'acétylation des histones serait influencée par les conditions précoces, avec un impact sur l'expression génique.** L'environnement *in utero* provoquerait **une réponse, différente selon le sexe du descendant, persistante dans le temps**. L'établissement du profil des modifications des histones et d'expression des modificateurs épigénétiques *in utero*, en réponse aux stimuli défavorables, ainsi que la susceptibilité aux maladies plus tard dans la vie, restent à définir.

5-6) Conclusions

Peu de preuves confirmant l'implication des mécanismes épigénétiques dans le concept de la DOHaD existent actuellement chez l'homme (Conradt et al., 2013; Heijmans et al., 2008; Oberlander et al., 2008; Tobi et al., 2009). Cela s'explique en grande partie par la difficulté d'obtenir des tissus fœtaux et adultes pour les analyses épigénétiques (Saffery and Novakovic, 2014). Il n'existe que peu de cohortes prospectives longitudinales, avec prélèvements des tissus métaboliques et des données de l'environnement parental. Les données obtenues sur les modèles animaux sont, par conséquent, cruciales pour la compréhension des mécanismes de la DOHaD.

L'ensemble des études citées dans cette partie de l'introduction, menées principalement chez les rongeurs, démontre que l'**environnement maternel** (nutrition, comportement, état psychologique…) **peut provoquer des altérations des marques épigénétiques** (méthylation de l'ADN et modifications des histones) **au niveau des gènes clé du métabolisme ou du développement chez la descendance** (Tableau III, Annexes). Une susceptibilité accrue aux pathologies métaboliques est alors observée. Chez la descendance exposée à un facteur délétère,

très tôt au cours du développement, la réponse au stress ou encore le comportement pourraient également être altérés.

Plusieurs tissus pourraient être affectés par l'environnement maternel : le foie, le placenta, le TAB, les cellules sanguines, le pancréas, le cerveau ou le muscle squelettique (Tableau III, Annexes). Dans cette introduction, les connaissances actuelles sur l'implication des mécanismes épigénétiques dans la DOHaD, dans le foie et le placenta, seront présentées dans le chapitre III.

Trouver des **marqueurs épigénétiques** serait un débouché très attractif de la recherche sur l'implication des mécanismes épigénétiques dans l'obésité et le concept de la DOHaD (Saffery and Novakovic, 2014). Les mesures de ces marqueurs doivent être possibles dans des tissus accessibles pour des analyses épigénétiques, comme le sang, le placenta ou le cordon ombilical. Une forte association d'une ou de plusieurs marques épigénétiques à une exposition délétère pourrait aider à prédire les risques de maladies ou la réponse au traitement à long terme.

Afin d'affirmer un **lien de causalité entre une marque épigénétique, induite tôt dans le développement, et une pathologie à l'âge adulte**, les études dans le domaine de la DOHaD doivent répondre à plusieurs questions :

- ✓ démontrer qu'une exposition à un environnement délétère pendant la période préconceptionnelle ou *in utero* altère le niveau de la marque épigénétique chez le fœtus (ou même dans les gamètes) ;
- ✓ démontrer le lien entre ces altérations épigénétiques et une pathologie à l'âge adulte ;
- ✓ établir le lien fonctionnel entre la marque altérée et le fonctionnement d'un organe (ou d'un système d'organes), menant à une pathologie. L'étude ne devrait pas être restreinte seulement aux effets sur un gène cible, mais plutôt sur le transcriptome ;
- ✓ explorer les mécanismes d'apposition ou d'enlèvement de cette marque, en prenant en compte l'ensemble de la machinerie épigénétique dont elle est cible ;
- ✓ effectuer des études cinétiques, car l'épigénome est dynamique et une marque peut être remplacée par une autre. Il est nécessaire de démontrer que les altérations épigénétiques précèdent le développement d'une pathologie associée.

Actuellement, les travaux dans ce domaine répondent seulement à une partie de ces questions, et rares sont ceux qui ont une approche plus complète (Saffery and Novakovic, 2014). **Les études longitudinales, s'intéressant à plusieurs tissus et marques épigénétiques, aideront à décrypter les mécanismes épigénétiques des effets parentaux sur la descendance**.

Chapitre III. Organes cibles du conditionnement développemental

L'obésité maternelle préconceptionnelle peut affecter tout d'abord les gonades, et en particulier la maturation ovocytaire, ce qui peut altérer les capacités au développement fœto-placentaire. L'obésité ou la surnutrition maternelle, au cours du développement *in utero*, ont un impact sur la morphogenèse de nombreux organes fœtaux. Le **développement cérébral** et ses circuits neuronaux peuvent être affectés par l'obésité maternelle (Ross and Desai, 2014). Des modifications de neurogenèse et de l'expression de neuropeptides dans l'hypothalamus sont à la base de conditionnement de l'hyperphagie chez la descendance (Chang et al., 2008; Gupta et al., 2008). La mémoire spatiale est également conditionnée par un environnement maternel riche en calories via des altérations du développement de l'hippocampe (Niculescu and Lupu, 2009; Tozuka et al., 2010). Chez l'homme, l'obésité maternelle est associée au risque de certaines perturbations mentales chez l'enfant : autisme, troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité, schizophrénie, anxiété et dépression (Sullivan et al., 2015).

L'obésité maternelle semble affecter le **développement du système cardio-vasculaire** du fœtus (le nombre et la maturation des cardiomyocytes, morphologie cardiaque…), augmentant le risque des malformations cardiaques congénitales (Mills et al., 2010; Roberts et al., 2015; Thornburg, 2015). Par conséquent, les descendants des mères obèses présentent une hypertrophie cardiaque pathologique, une hypertension et une dysfonction endothéliale et encourent ainsi un risque de mort par maladies cardio-vasculaires plus tard dans la vie (Blackmore et al., 2014; Gaillard, 2015; Reynolds et al., 2013). Peu d'évidences montrent l'effet de la surnutrition et de l'obésité maternelle sur le **développement rénal** (Wood-Bradley et al., 2015). Toutefois, une activité rénale réduite pourrait contribuer à l'hypertension chez les descendants adultes des mères sous HFD (Armitage et al., 2005).

Le nombre des adipocytes, leur taille et le métabolisme lipidique du **tissu adipeux blanc** sont conditionnés par l'obésité maternelle *in utero* (Lecoutre and Breton, 2014). Chez l'homme, l'adiposité fœtale est augmentée chez les mères obèses (Catalano et al., 2009a). Ces altérations précoces se traduisent par une adiposité accrue chez la descendance après la naissance, contribuant ainsi au conditionnement développemental de l'obésité (Lake et al., 1997; Poston, 2012; Whitaker, 2004).

Chez la souris, le régime HFD chez la mère est associé avec un retard du **développement pulmonaire** au terme de gestation et au jour postnatal 15 (Mayor et al., 2015).

Le **développement du pancréas** endocrine est sensible à l'obésité maternelle (O'Dowd and Stocker, 2013). Un nombre réduit et un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques, suite à l'exposition à l'environnement délétère, au cours du développement mènent à la résistance à l'insuline à l'âge adulte (Cerf et al., 2005; Cerf et al., 2015).

Dans le chapitre III, je m'intéresserai plus particulièrement aux organes/tissus cibles de l'obésité de la femelle : les ovocytes, le placenta, organe crucial au développement fœtal, et le foie fœtal, comme tissu métabolique majeur.

1) Ovocytes: médiateurs des effets maternels préconceptionnels sur le phénotype de la descendance

Divers facteurs pourraient tout d'abord affecter des ovocytes en maturation chez la femelle, bien avant la conception. Les processus épigénétiques, produits dans les ovocytes en réponse à un environnement maternel, semblent être une piste intéressante à explorer, afin de comprendre les mécanismes de "mémoire" chez le fœtus, en cas d'exposition à l'obésité maternelle en période préconceptionnelle. Une revue sur le sujet est jointe dans les annexes (Article 8, Junien et al., 2015, Annexes).

1-1) Effets de l'obésité maternelle sur les ovocytes

En cas d'obésité ou de perte de poids préconceptionnelles, les ovocytes subiraient diverses altérations, ce qui pourrait entrainer des conséquences sur le phénotype des descendants à long terme. Le liquide folliculaire, qui entoure l'ovocyte, constitue son environnement nutritionnel et reflète le statut métabolique maternel. Chez les femmes obèses, le **contenu des métabolites est altéré dans le liquide folliculaire** (Robker et al., 2009). L'IMC de ces femmes est corrélé avec les taux d'insuline, de lactate, des TG et de la protéine C-réactive, marqueur de l'état inflammatoire, contenus dans le liquide folliculaire.

Dans l'ovaire d'une souris obèse, une **apoptose des follicules** est observée, ainsi qu'une diminution du nombre des ovocytes matures, qui sont de plus petite taille (Jungheim et al., 2010). L'alimentation maternelle, au cours de la maturation ovocytaire, peut influencer le contenu en lipides dans l'ovocyte et **l'activité des mitochondries**. Celles-ci sont nécessaires

pour assurer la demande en énergie lors du développement embryonnaire (Lane et al., 2014). Chez la souris, le régime HFD provoque une **accumulation accrue des lipides dans les ovocytes**, ainsi qu'une diminution du potentiel membranaire mitochondrial (Wu et al., 2010). L'expression d'*Atf4* (activating transcription factor 4), marqueur du stress de réticulum endoplasmique (RE), et le taux d'apoptose sont augmentés dans les cellules de la granulosa et dans le complexe cumulus/ovocyte. Ces signes de **l'environnement lipotoxique** sont associés à une **diminution de la fertilité** chez ces souris obèses. Chez la femme obèse, le stress du RE est également observé dans les cellules de la granulosa (Wu et al., 2010).

Dans une autre étude, des perturbations d'alignement des chromosomes et une aneuploïdie, nombre anormal de chromosomes, sont observées dans 45% des ovocytes matures (en métaphase II) des souris obèses (Luzzo et al., 2012). L'obésité maternelle provoque également des perturbations de la fonction et de la morphologie mitochondriale dans l'ovocyte et dans les cellules de la granulosa. Ensuite, un transfert des blastocystes des souris sous régime HFD chez des femelles non-obèses a été effectué, afin d'étudier l'effet de l'obésité uniquement au cours du développement précoce, indépendamment des conditions post-implantatoires. Des pertes embryonnaires sont également constatées (au stade de 2 cellules et du blastocyste), ainsi qu'**une restriction de la croissance fœtale** et des **anomalies du développement cérébral** chez le fœtus à E14.5. Cette restriction de croissance serait liée à une diminution de l'expression protéique du récepteur IGF1r (insulin-like growth factor 1 receptor) dans le blastocyste (Jungheim et al., 2010). Les descendants exposés à l'obésité maternelle pendant la période de l'ovogenèse et la gestation, présentent les signes du **syndrome métabolique** : poids, adiposité, intolérance au glucose et cholestérolémie élevés.

L'ovocyte est ainsi hautement sensible à l'obésité maternelle : accumulation des lipides, dysfonctionnement mitochondrial et anomalies chromosomiques sont observés, ce qui peut mener à des défauts du développement, aboutissant à des pertes embryonnaires. L'ensemble de ces résultats permet de supposer que des conséquences néfastes de l'obésité sur la descendance pourraient être transmises, en partie, via l'impact négatif sur l'ovocyte au cours de la période préconceptionnelle. Une correction de l'obésité maternelle bien avant la gestation, par une perte de poids et une normalisation des paramètres métaboliques, pourrait normaliser l'environnement lipotoxique de l'ovocyte. Les données sur cette question étant absentes dans la littérature, des recherches sont nécessaires pour répondre à cette question.

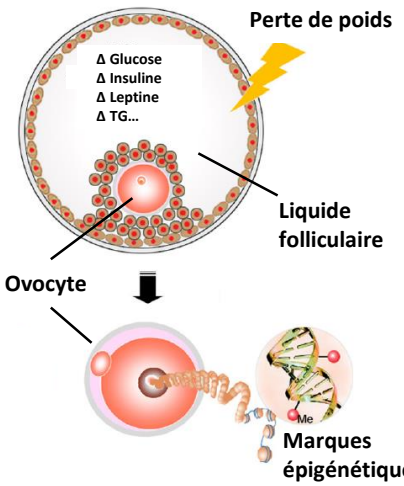


Figure 33. Mécanismes potentiels conduisant à la modification des marques épigénétiques dans les ovocytes, induite par la perte de poids

L'ovocyte est entouré par le liquide folliculaire, qui représente son environnement nutritionnel et reflète le statut métabolique de la mère. Les facteurs environnementaux, qui varient selon les conditions métaboliques de la mère, pourraient entrer dans l'ovocyte et affecter son épigénome.

Adapté de Wei et al., 2015

1-2) Altérations épigénétiques dans les ovocytes

Des marques épigénétiques dans l'ovocyte pourraient être modifiées par le métabolisme maternel. De récentes études se sont intéressées aux effets de l'obésité sur la méthylation dans l'ovocyte murin. Cette marque s'avère en effet sensible à l'environnement maternel au cours de la maturation ovocytaire. Le régime HFD et l'obésité chez la souris provoquent une hyperméthylation du promoteur de *Lep* (leptine) dans les ovocytes, tandis que le promoteur de *Pparα,* le régulateur majeur du métabolisme lipidique, est hypométhylé (Ge et al., 2013). Ces mêmes altérations de la méthylation sont également retrouvées dans le foie des descendantes femelles à l'âge adulte, mais pas dans celui des mâles. De plus, la méthylation des promoteurs de ces 2 gènes semble bien réguler leur expression : le gène *Lep* est réprimé, alors que le *Pparα* est surexprimé.

Dans une étude récente, déjà mentionnée dans le chapitre I (page 27), Wei et collègues ont démontré les effets bénéfiques de l'exercice préconceptionnel, les 4 semaines précédant la conception, sur le phénotype métabolique de la descendance adulte (Tableau I, Annexes). Afin de tester l'hypothèse, selon laquelle le conditionnement développemental pourrait être médié par l'altération des ovocytes, les auteurs ont effectué le transfert des ovocytes fécondés des femelles qui avaient pratiqué de l'exercice physique, chez des femelles contrôles (Wei et al., 2015). Le phénotype des descendants adultes, issus de ces transferts, est similaire au phénotype de ceux élevés par leurs mères biologiques, exposées à l'exercice physique. Une hyperméthylation des gènes de la synthèse du cholestérol, ainsi qu'une hypométhylation d'un gène de la β-oxydation des AG, sont observées dans les ovocytes des mères qui ont pratiqué de l'exercice physique. Ces **altérations de la méthylation de l'ADN** sont retrouvées également au stade blastocyste (E3.5), ainsi que dans le foie des descendants au jour post-natal 21, suggérant une **transmission de cette marque épigénétique de l'ovocyte à l'individu adulte**. De plus, une dérégulation de l'expression d'environ 800 gènes est observée dans les ovocytes des femelles exerçant de l'activité physique. De manière intéressante, le phénotype de la descendance de la 2ème génération est également amélioré par l'exercice de leurs grand-mères.

L'ensemble de ces résultats témoigne de l'**effet majeur de la physiologie de la mère sur ses ovocytes**. L'effet transgénérationnel de la perte de poids pourrait être médié par des altérations de la méthylation de l'ADN dans l'ovocyte (Figure 33). De nouvelles recherches seraient nécessaires pour déterminer, dans les ovocytes, la réponse des modifications des histones à l'obésité.

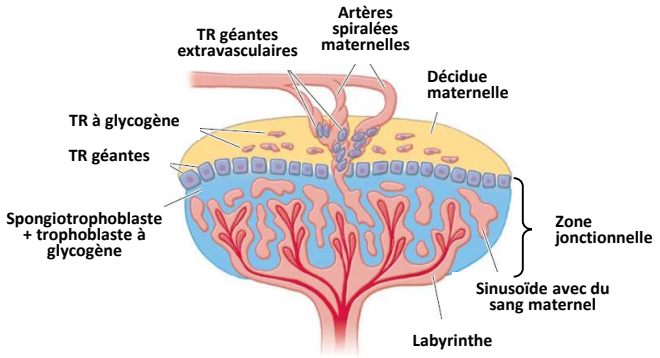


Figure 34. Morphologie du placenta murin

Le placenta (représenté au jour embryonnaire 14.5) est constitué de 3 zones : le labyrinthe (en rouge), la zone jonctionnelle (en bleu) et la décidue maternelle (en jaune). Les surfaces occupées par ces 3 zones placentaires évoluent constamment jusqu'à la fin de la gestation.

TR – cellules trophoblastiques.

Adapté de Watson et Cross, 2005

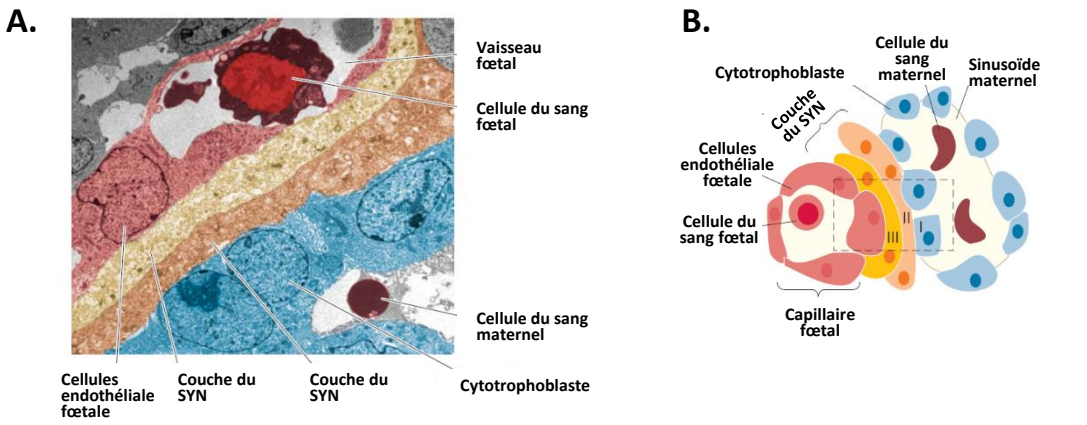


Figure 35. Structure du barrière fœto-placentaire dans le labyrinthe chez la souris

Les vaisseaux fœtaux formés par des cellules endothéliales, sont séparées du sang maternel par 3 couches de cellules trophoblastiques: le cytotrophoblaste mononucléaire et deux couches de syncytiotrophoblaste (SYN), contenant plusieurs noyaux.

(A) Vue en microscopie électronique

(B) Schéma

Adapté de Watson et Cross, 2005

2) Placenta

2-1) Morphologie du placenta chez la souris

Le placenta est un organe extra-embryonnaire, crucial pour le développement et la survie fœtale chez les mammifères placentaires. Issu du trophectoderme du blastocyste, il est composé de cellules provenant de la mère et du fœtus et assure les interactions entre les deux.

2-1-1) Les trois zones fonctionnelles du placenta murin

Le placenta murin se divise en trois zones distinctes, chacune étant dotée de types cellulaires et de fonctions physiologiques spécifiques : deux zones d'origine fœtale, le labyrinthe et la zone jonctionnelle et une zone d'origine maternelle, la décidue basale (Figure 34).

Le labyrinthe est la zone formée par les cellules trophoblastiques (**cytotrophoblastes**) enfermant des **lacunes sanguines maternelles** et les vaisseaux fœtaux. C'est le site des échanges de nutriments, de métabolites et de gaz entre les sangs maternels et fœtaux (Watson, 2005). Le placenta murin étant de type hémochorial, le trophoblaste est en contact direct avec le sang maternel. Les **artères et veines fœtales**, formées par les cellules endothéliales, sont séparées du sang maternel par 3 couches de cellules trophoblastiques (Georgiades et al., 2002; Rossant and Cross, 2001; Watson, 2005). En contact avec le sang maternel, une monocouche de cyto trophoblastes mononucléés borde les sinusoïdes maternelles. Deux couches de syncytiotrophoblastes plurinucléées, formées par la fusion de cytotrophoblastes, se situent entre les vaisseaux fœtaux et le cytotrophoblaste (Figure 35). Les couches de syncytiotrophoblaste et de cytotrophoblaste permettent les **échanges physiologiques entre sang fœtal et maternel** (Watson, 2005).

La zone jonctionnelle (ZJ) permet l'ancrage du placenta dans la décidue maternelle, le maintien structurel du labyrinthe, la sécrétion des hormones et des cytokines, ainsi que le stockage du glycogène. Elle contient le **spongiotrophoblaste** et les **cellules à glycogène**, dont la fonction n'est pas très bien connue (Georgiades et al., 2002). La ZJ est séparée de la décidue maternelle par une couche de **cellules trophoblastiques géantes polyploïdes**. Ces cellules, qui jouent un **rôle important dans l'implantation du blastocyste** et dans la formation de la décidue maternelle, sécrètent des **hormones** et des **cytokines**, nécessaires au maintien de la

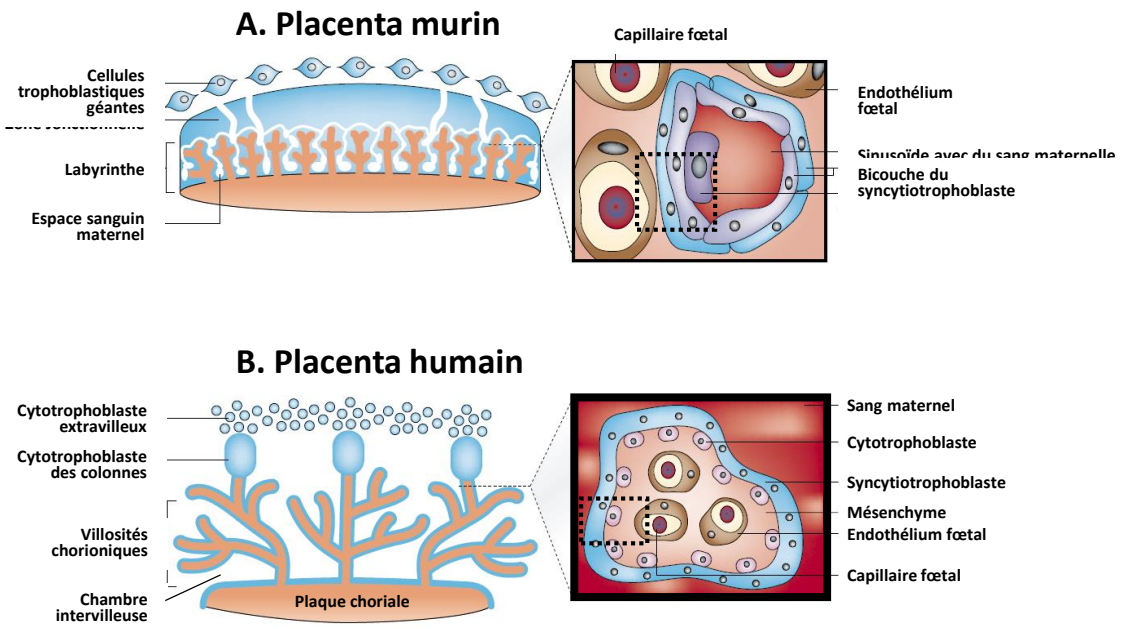


Figure 36. Comparaison de la morphologie du placenta et de la barrière placentaire chez l'homme et chez la souris

(A) Morphologie du placenta murin. Les villosités du labyrinthe (en marron) sont en contact avec les sinusoïdes avec du sang maternel (en blanc), qui traversent la zone jonctionnelle (en bleu). Les cellules trophoblastiques géantes séparent la partie fœtale du placenta de la décidue maternelle. Dans l'encadré: La barrière placentaire, constituée des 3 couches du trophoblaste (couche du cytotrophoblaste, bicouche du syncytiotrophoblaste,) et de l'endothélium fœtal.

(B) Morphologie du placenta humain. Les villosités de la plaque choriale (en marron) flottent dans les chambres intervilleuses (en blanc), remplies de sang maternel. Des colonnes de cytotrophoblastes permettent l'encrage des villosités dans l'endomètre. Les cytotrophoblastes extravilleux permettent l'invasion dans les tissus maternels. Dans l'encadré: La barrière placentaire, constituée du syncytiotrophoblaste et des îlots de cytotrophoblaste.

Les structures dérivées du trophoblaste sont représentés en bleu, du mésoderme – en marron.

Adapté de Rossant et Cross, 2001

grossesse (Hu and Cross, 2010). Les cellules trophoblastiques géantes se trouvent également dans les sinusoïdes du labyrinthe. Une autre population de cellules trophoblastiques borde les artères spirales maternelles de la décidue et participe au remodelage des vaisseaux maternels (Hu and Cross, 2010).

La décidue maternelle, *decidua basalis*, est composée de vaisseaux maternels, dont les **artères spiralées**, ainsi que des **cellules déciduales**, cellules du stroma utérin, différenciées au cours de l'implantation (Georgiades et al., 2002). Cette zone maternelle contribue au maintien de la grossesse : elle protège les tissus maternels contre l'invasion des trophoblastes et prémunit le fœtus du rejet par le système immunitaire maternel. Les cellules déciduales sont polyploïdes et contiennent du glycogène et des lipides, source de nutriments pour le fœtus (Kearns and Lala, 1983). Des cellules trophoblastiques à glycogène provenant de la ZJ sont également présentes dans la décidue (Georgiades et al., 2002).

2-1-2) Comparaison de la morphologie du placenta chez l'homme et chez la souris

Bien que le placenta de la souris et celui de l'homme montrent certaines différences structurelles, ils présentent aussi de nombreuses similitudes (Georgiades et al., 2002; Rossant and Cross, 2001). Chez ces deux espèces, le placenta est de type discoïdal, c'est-à-dire que la zone de contact entre le fœtus et l'utérus a une forme circulaire. Les placentas murin et humain sont hémochoriaux : l'épithélium et l'endothélium des vaisseaux maternels sont détruits, le sang maternel est ainsi en contact direct avec le trophoblaste placentaire. La **barrière placentaire**, constituée de cellules trophoblastiques et de cellules endothéliales des vaisseaux fœtaux, sépare le sang maternel du sang fœtal. Cependant, chez la souris, cette barrière est de type **trichorial**, c'est-à-dire qu'elle est composée de 3 couches trophoblastiques : 1 couche de cytotrophoblastes et 2 couches de syncytiotrophoblastes. Chez l'Homme, en revanche, la barrière est **bichoriale** et inversée, soit une couche de syncytiotrophoblaste au contact du sang maternel et des îlots de cytotrophoblastes sous-jacents (Figure 36) (Rossant and Cross, 2001).

A la différence du **placenta labyrinthique de la souris**, chez l'homme le trophoblaste forme des villosités regroupées dans des structures circulaires, appelées cotylédons (Rossant and Cross, 2001). Néanmoins, les cotylédons étant séparés par des cloisons incomplètes, le **placenta humain est dit pseudo-cotylédoné**.

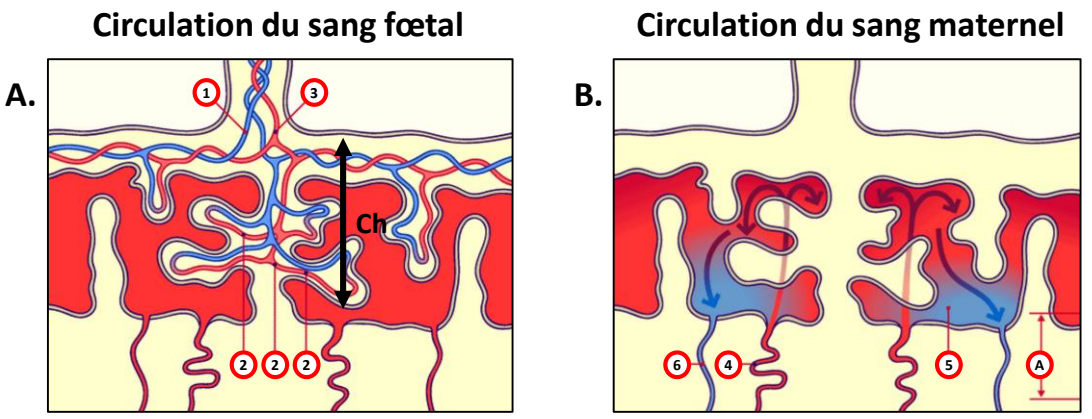


Figure 37. Circulation du sang fœtal (A) et maternel (B) dans le placenta chez l'homme

(A) Les artères ombilicales (1, en bleu) amènent le sang désoxygéné en provenance du fœtus, qui traverse la plaque choriale (Ch) pour arriver dans les capillaires fœtaux (2) des villosités. Après avoir échangé avec le sang maternel à travers la barrière placentaire, le sang riche en oxygéné et nutriments retourne dans la circulation fœtale par la veine ombilicale (3, en rouge).

(B) Le sang maternel oxygéné arrive de la plaque basale (décidue maternelle) (A) par les artères spirales (4), dans la chambre intervilleuse (5) (flèches rouges). Après les échanges nutritionnels et respiratoires avec les villosités, le sang désoxygéné et contenant des déchets métaboliques excrétés par le fœtus, retourne dans la circulation maternelle par les veines utérines (6) (flèches blues).

Adapté du site *http://www.embryology.ch/francais/fplacenta/circulplac01.html, consulté le 5/05/2015*

De plus, chez la souris, l'invasion trophoblastique dans les tissus maternels est moins prononcée que chez l'homme : le trophoblaste murin envahit seulement la décidue, alors que les trophoblastes humains entrent plus profondément, à la limite du myomètre utérin (Georgiades et al., 2002).

Malgré ces différences structurelles**, les zones du placenta semblent avoir des fonctions similaires chez ces deux espèces** (le labyrinthe et les villosités du chorion, la zone jonctionnelle et la plaque basale, respectivement chez la souris et chez l'homme). De plus, les cellules trophoblastiques géantes murines sont analogues au cytotrophoblaste invasif extravilleux humain (Georgiades et al., 2002; Rossant and Cross, 2001). **La souris peut ainsi servir de modèle pour étudier les effets de la santé maternelle sur la croissance du fœtus.**

2-2) Rôle du placenta dans le développement embryonnaire

De nombreuses **fonctions du placenta sont vitales pour le développement du fœtus**, assurant sa croissance, respiration, excrétion des déchets métaboliques et protection immunitaire. La grossesse est maintenue en partie grâce aux hormones produites par le trophoblaste.

2-2-1) Fonction nutritionnelle du placenta

Le placenta forme l'**interface entre la circulation sanguine maternelle et fœtale**, afin d'assurer, tout d'abord, les échanges métaboliques et gazeux. Pendant la grossesse, le placenta apporte à l'embryon, puis au fœtus, l'eau, les ions, les nutriments et l'oxygène nécessaires à son développement (Watson, 2005). Le sang maternel oxygéné, amené par les artères spiralées à travers la décidue basale, se déverse dans les sinusoïdes du labyrinthe. Les nutriments et l'oxygène passent du sang artériel maternel à travers la barrière placentaire dans les capillaires fœtaux du labyrinthe. Les nutriments et l'oxygène sont ensuite transportés par la veine ombilicale vers le fœtus (Figure 37). Les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone qu'excrète le fœtus, sont éliminés par les 2 artères ombilicales. Ce sang désoxygéné retourne par les veines utérines dans la circulation maternelle (Wang, 2010). Le placenta assure ainsi la fonction nutritionnelle et respiratoire du fœtus.

La croissance du fœtus dépend de la capacité du placenta à lui fournir des nutriments provenant de la circulation sanguine de la mère. Le placenta lui-même est capable de stocker du glycogène et des lipides, sources nutritionnelles pour le fœtus

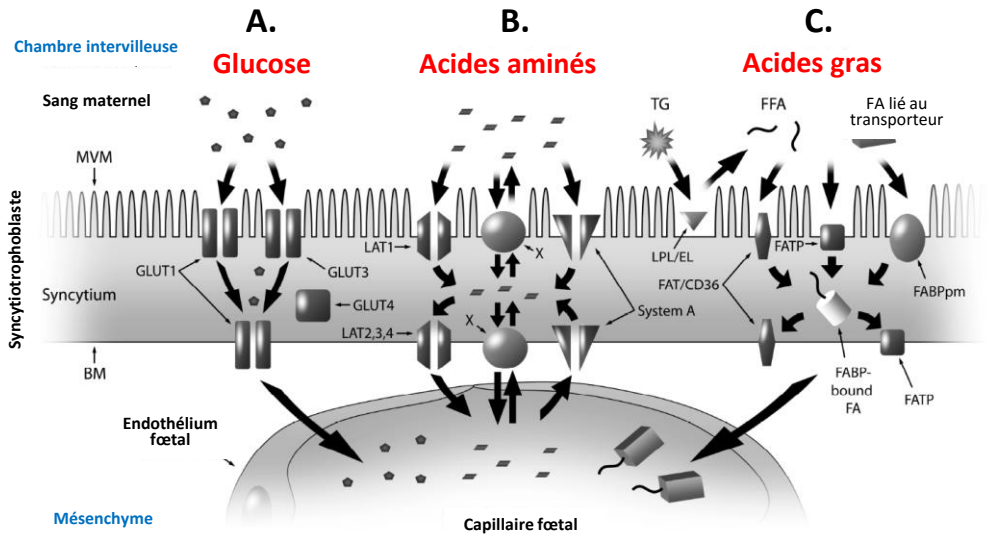


Figure 38. Le transport du glucose, des acides aminés et des acides gras à travers la barrière placentaire chez l'homme

Les macronutriments passent tout d'abord à travers la membrane microvilleuse (MVM) et la membrane basale (BM) du syncytiotrophoblaste, puis à travers l'endothélium du capillaire fœtal, afin d'accéder au sang fœtal.

(A) Les transporteurs du glucose (GLUT1, GLUT3) sont localisés sur la MVM et la BM du syncytiotrophoblaste.

(B) Les transporteurs des acides aminés (AA), le système A (spécifiques des petits AA neutres) et le système L (spécifiques des grands AA neutres), sont localisés sur la MVM et la BM, ainsi que des transporteurs d'échange des acides aminés (X).

(C) Les triglycérides (TG) ne pouvant pas passer la barrière, ils sont lysés par la lipoprotéine lipase (LPL) placentaire qui est localisé sur la MVM. Les acides gras libres (FFA) traversent la MVM via la FAT/CD36 (translocase de AG), la FATP (protéine de transport des AG) ou FABPpm (protéine de liaison des AG membranaire). Dans le cytoplasme du syncytiotrophoblaste, la FABP (protéine de liaison des AG) emmène les AG vers la BM, ou ils sont transportés dans le mésenchyme par FATP et FAT/CD36.

GLUT – glucose transporter, LAT – large neutral amino acid transport, LPL – lipoprotein lipase, EL – endothelial lipase, FAT/CD36 – fatty acid translocase, FATP – fatty acid transport protein, FABP - fatty acid binding protein, FABPpm – plasma membrane fatty acid binding protein.

Adapté de Brett et al., 2014

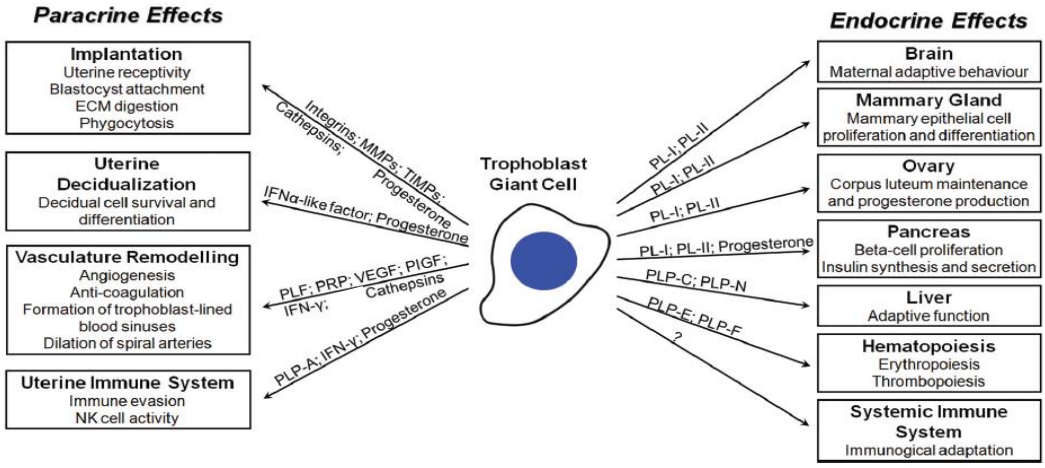


Figure 39. Fonction paracrine et endocrine des cellules trophoblastiques géantes

De nombreuses hormones et cytokines, produites par les cellules trophoblastiques géantes, régulent l'implantation, la décidualisation, le remodelage de la vascularisation, ainsi que l'immunité utérine. De plus, ces cellules ont des effets endocrines sur le comportement maternel, le développement de la glande mammaire, les fonctions des ovaires, du pancréas et du foie, sur l'hématopoïèse et sur le système immunitaire.

ECM – la matrice extracellulaire, MMPs – les métalloprotéases matricielles, TIMPs – les inhibiteurs tissulaires de la métalloprotéinase, IFNα-like factor – facteur interféron α-like, PLF - proliférine, PRP – proliférine-related protéine, VEGF – le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor), PlGF – le facteur de croissance placentaire (placental-like growth factor), IFN-γ – interféron γ, PLP - prolactine-like protéine, PL - hormone lactogène placentaire

Adapté de Hu et Cross, 2010

(Georgiades et al., 2002). **Le passage des nutriments à travers la barrière placentaire est possible grâce au transport actif, contre le gradient de concentrations et nécessitant de l'énergie, transport facilité, par diffusion libre ou endocytose / exocytose** (Desforges and Sibley, 2010). Différents types de transporteurs sont localisés sur la surface du syncytiotrophoblaste ou du cytotrophoblaste, permettant le passage des **ions**, des **acides aminés**, du **glucose**, des **AG** et du **cholestérol** (Figure 38) (Brett et al., 2014). Les ions sont transportés à l'aide de divers canaux (par exemple, pour K^+ et Cl^-) ou de transporteurs membranaires. Le transport de deux ions différents dans le même sens ou dans le sens opposé est possible (Desforges and Sibley, 2010). Les acides aminés sont transportés par des canaux spécifiques au type d'acide aminé, le système A et le système L, ainsi que par des protéines d'échange. Le glucose est fourni au fœtus par les protéines transportrices GLUT1 et GLUT3 (Glucose transporter). Les acides gras libres traversent la barrière placentaire grâce à la translocase des AG (FAT/CD36, fatty acid translocase) ou la protéine de transport des AG (FATP, Fatty acid (long chain) transport protein). L'eau pénètre la barrière grâce aux aquaporines, qui forment des pores perméables uniquement à l'eau (Damiano, 2011).

Différents facteurs influencent l'accessibilité des nutriments au fœtus : la surface d'échange dans le labyrinthe, l'épaisseur de la barrière placentaire, l'expression des transporteurs, le gradient de concentration des nutriments entre le sang maternel et fœtal et la pression sanguine (Brett et al., 2014). La morphologie et la vascularisation du placenta sont primordiales dans ces processus.

2-2-2) Fonction endocrine du placenta.

Le placenta est un organe endocrine : **les cellules trophoblastiques géantes secrètent des hormones et des facteurs de croissance dans la circulation fœtale et maternelle** (Figure 39) (Hu and Cross, 2010). Certaines hormones participent à la mise en place des structures placentaires : pour l'implantation (attachement du blastocyste, lyse des tissus maternels), la formation de la décidue maternelle, l'angiogenèse et le contrôle du flux sanguin. Les hormones sécrétées, telles que la **progestérone**, jouent ainsi un rôle important dans l'adaptation maternelle à la gestation (Figure 39). L'hormone **lactogène placentaire**, issue de la même famille que l'hormone de croissance et la prolactine, est nécessaire pour la stimulation des glandes mammaires, l'adaptation du comportement et du métabolisme maternel, le maintien du corps jaune dans les ovaires, et l'apport du glucose au fœtus. L'ensemble des substances

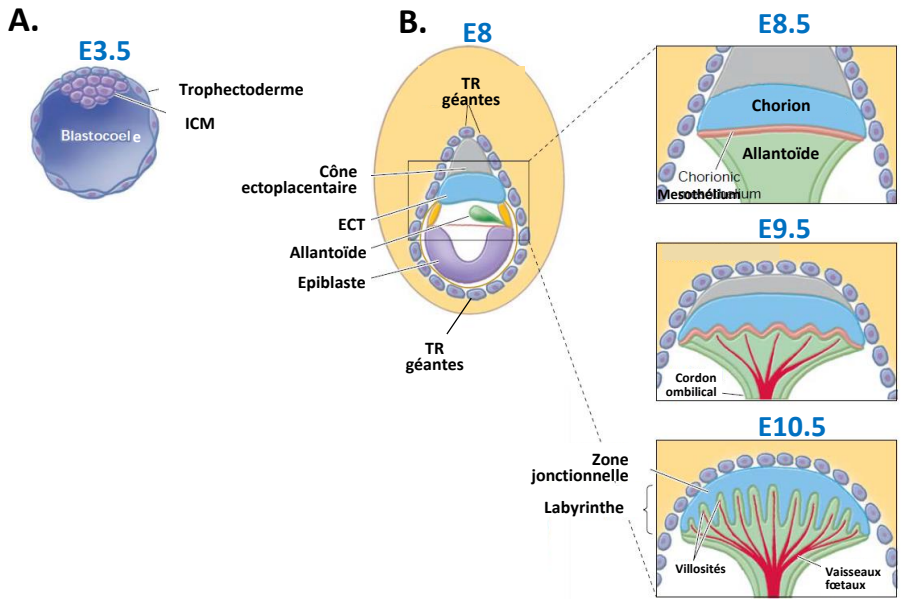


Figure 40. Développement du placenta murin

(A) Le blastocyste précoce (E3.5) contient une cavité, le blastocœle, la masse cellulaire interne (ICM) et le trophectoderme. L'embryon est dérivé de l'ICM, alors que le placenta est dérivé du trophectoderme. Dans le blastocyste tardif (E4.0), l'ICM se divise en épiblaste, précurseur de l'ectoderme, mésoderme et endoderme embryonnaires, et en hypoblaste.

(B) Les cellules géantes trophoblastiques (TR géantes) proviennent des cellules du trophectoderme, qui ne sont pas en contact avec l'ICM. La fusion du chorion avec l'allantoïde se produit à E8.5, suivie de la ramification des villosités, afin de former le labyrinthe (E8.5-10.5).

TR – cellules trophoblastiques; ECT – ectoderme extraembryonnaire; ICM - masse cellulaire interne (inner cell mass).

Adapté de Watson et Cross, 2005

produites par le placenta permet le **maintien de la surface fœto-maternelle** (effet paracrine) et de la gestation (effet endocrine) (Hu and Cross, 2010).

2-2-3) Fonction immunitaire du placenta

Le placenta forme une barrière immunitaire qui protège le fœtus des pathogènes. De plus, les cellules trophoblastiques géantes secrètent des facteurs, la progestérone et la PLP-A (prolactin-like protein-A) pour réguler le système immunitaire utérin, afin de prévenir le rejet du fœtus (Hu and Cross, 2010; Watson, 2005).

2-2-4) Conclusions sur les fonctions du placenta

Les perturbations du fonctionnement placentaire ont des conséquences pour la santé et la survie du fœtus. Par exemple, en cas d'insuffisance vasculaire utéroplacentaire associée à une circulation sanguine réduite, le placenta est incapable de fournir l'oxygène et les nutriments au fœtus de façon adéquate. La pré-éclampsie, une maladie sévère associée à une hypertension maternelle, est liée à un défaut d'invasion trophoblastique et à une résistance vasculaire élevée du placenta. Cette pathologie peut provoquer une restriction de croissance fœtale, un risque de prématurité, des anomalies congénitales ou même un risque de mortinatalité (Baumwell and Karumanchi, 2007). **Le développement correct du placenta est ainsi indispensable pour la croissance et le développement fœtal.**

2-3) Développement placentaire chez la souris

Le placenta est dérivé du trophectoderme, une couche cellulaire externe du blastocyste précoce (E3.5, pour jour embryonnaire 3.5), alors que l'embryon provient de la masse cellulaire interne (inner cell mass, ICM) (Figure 40) (Watson, 2005).

2-3-1) Implantation du blastocyste et cellules trophoblastiques

La placentation commence au jour E4.5, lors de l'implantation du blastocyste. Les cellules géantes trophoblastiques proviennent des cellules du trophectoderme, qui ne sont pas en contact avec l'ICM. Elles acquièrent des capacités invasives : grâce à la lyse des cellules endothéliales de l'utérus, elles pénètrent dans la décidue maternelle afin d'avoir accès au sang maternel (Figure 40) (Hu and Cross, 2010; Watson, 2005). Les cellules adjacentes à l'ICM se

différencient soit en trophectoderme chorionique, qui sera par la suite à l'origine du syncytiotrophoblaste et du cytotrophoblaste, soit en cône ectoplacentaire, précurseur de la ZJ.

2-3-2) Formation du labyrinthe et de la zone jonctionnelle chez la souris

Le chorion, la membrane fœtale la plus externe, dérivée de l'ectoderme extraembryonnaire, forme les villosités du labyrinthe (Figure 40). En revanche, les vaisseaux fœtaux se développent à partir de l'allantoïde, d'origine mésodermique (Watson, 2005). Chez la souris, la **fusion du chorion avec l'allantoïde** se produit à E8.5, afin de former le labyrinthe. Puis, les villosités du labyrinthe continuent à se développer et à se ramifier jusqu'à E18.5-19.5, soit la fin de la gestation chez la souris (Watson, 2005).

Le labyrinthe est maintenu au cours de la placentation par la ZJ. Le spongiotrophoblaste provient du cône ectoplacentaire (Hemberger, 2007). Les cellules à glycogène se différencient à partir des spongiotrophoblastes dans la ZJ et diffusent par la suite dans la décidue maternelle (Watson, 2005). Les **cellules géantes trophoblastiques**, provenant du trophectoderme, **forment une couche entre la ZJ et la décidue maternelle**, bordant le site de l'implantation.

2-3-3) Formation de la décidue maternelle

Dans la zone d'implantation du blastocyste, les fibroblastes de l'endomètre maternel se différencient en cellules déciduales. Cette différenciation, accompagnée de la vascularisation de l'endomètre, se nomme décidualisation (Georgiades et al., 2002).

2-3-4) Gènes impliqués dans le développement placentaire

De nombreuses études de mutation et d'invalidation génique chez la souris ont mis en évidence des gènes responsables du développement placentaire (Watson, 2005). Par exemple, l'invalidation de ***Pparγ*** (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) est létale : la mort embryonnaire survient entre E9.5 et E12.5 (Barak et al., 1999). *Pparγ*, indispensable pour le développement vasculaire du labyrinthe s'exprime dans les trophoblastes du labyrinthe et dans les spongiotrophoblastes. Des échanges métaboliques insuffisants, à cause d'une angiogenèse altérée, ainsi que la diminution de l'accumulation des lipides dans le trophoblaste chez ces souris aboutiraient à la mort fœtale (Barak et al., 1999).

Un autre facteur de transcription, ***Gcm1*** (Glial cells missing homolog 1), est lui aussi indispensable pour le développement du labyrinthe (Watson, 2005). Ce facteur est exprimé dans les cellules trophoblastiques ; son invalidation mène à une absence de formation du syncytiotrophoblaste, une absence de la ramification des villosités et, par conséquent, à la mort embryonnaire à E10 (Anson-Cartwright et al., 2000).

L'ensemble de ces données atteste le rôle primordial du labyrinthe dans la survie du fœtus.

2-4) Epigénétique placentaire

Les processus épigénétiques sont impliqués dans le développement placentaire (Hemberger, 2007). Les travaux d'invalidation génique montrent l'implication des gènes de la méthylation de l'ADN et des histones, ainsi que de l'acétylation des histones, dans la morphogenèse des tissus extra-embryonnaires (Arima et al., 2006; Lagger et al., 2002; O'Carroll et al., 2001; Tachibana et al., 2002). Le placenta est caractérisé par des signatures épigénétiques particulières.

2-4-1) Méthylation de l'ADN

Le niveau global de la méthylation de l'ADN n'est pas homogène dans le blastocyste murin : le trophectoderme est moins méthylé que l'ICM (Santos et al., 2002). Cette asymétrie du niveau de méthylation se retrouve plus tard dans le développement, **le placenta étant hypométhylé par rapport à d'autres tissus embryonnaires ou adultes** (Chapman et al., 1984; Ehrlich et al., 1982; Gallou-Kabani et al., 2010; Nelissen et al., 2011; Razin et al., 1984; Rossant et al., 1986). Dans le placenta humain, au 1er trimestre ou à terme, la méthylation globale est faible, moins de 3% (Novakovic et al., 2010). De manière intéressante, le taux de méthylation de l'ADN est plus élevé dans le placenta des fœtus mâles par rapport à celui des fœtus femelles chez la souris (Gallou-Kabani et al., 2010).

Une récente étude apporte plus de précisions sur l'organisation du méthylome placentaire humain (Schroeder et al., 2013). **L'épigénome placentaire contient des domaines partiellement méthylés** (PMD, partially methylated demain), qui couvrent 37% du génome placentaire (17% des gènes humains). Les gènes dans ces régions sont transcriptionnellement réprimés et leurs promoteurs sont généralement hyperméthylés.

Malgré le faible niveau de méthylation de l'ADN du trophoblaste, cette marque épigénétique joue un rôle très important dans le développement placentaire (Nelissen et al., 2011). L'ADN méthyltransferase *Dnmt3l*, qui est fortement exprimée dans le chorion, joue un rôle important dans la morphogenèse du placenta. Le développement placentaire est perturbé chez les embryons hétérozygotes des souris invalidées pour *Dnmt3l* : absence du labyrinthe, moindre invasion des vaisseaux fœtaux dans le chorion et zone jonctionnelle de plus petite taille (Arima et al., 2006). En outre, le placenta mutant contient plus de cellules trophoblastiques géantes, et des malformations de l'allantoïde sont également observées. L'ensemble de ces défauts placentaires est létal pour le fœtus à E9.5. **La méthylation de l'ADN parait indispensable à la régulation de la spécialisation des lignées trophoblastiques** (Nelissen et al., 2011; Rugg-Gunn, 2012).

Dans le placenta, le rôle des **gènes soumis à l'empreinte parentale** a été particulièrement étudié (Tycko, 2006). Ces gènes s'expriment à partir d'un seul allèle, d'origine maternelle ou paternelle, impliquant des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, des modifications des histones et des longs ARN non-codants. De manière intéressante, au cours de l'évolution, placentation et empreinte parentale sont apparus de façon concomittante, suggérant une contribution particulière de ces gènes au développement placentaire et à sa contribution dans le développement fœtal. Dans le placenta, nombreux gènes sont soumis à empreinte et, en plus, certains de ces gènes ont une expression biallélique dans d'autres tissus somatiques. Des perturbations de l'empreinte parentale peuvent conduire à des altérations de la croissance fœtale et placentaire (Nelissen et al., 2011).

Chez la souris, **la méthylation de l'ADN est dynamique** au cours de la morphogenèse placentaire : son niveau augmente d'environ 20% en fin de gestation (Gabory et al., *in prep*). De manière intéressante, il existe une différence de méthylation globale de l'ADN entre les zones placentaires : le labyrinthe est plus fortement méthylé par rapport à la ZJ. Cela illustre **l'importance d'étudier les mécanismes épigénétiques séparément dans les différentes zones placentaires** *in vivo*, vu leur fonction et leur composition cellulaire distinctes.

L'hydroxyméthylation de l'ADN et les enzymes TET (Ten-eleven translocation) sembleraient avoir un rôle important dans le développement de la lignée trophoblastique (Tanaka et al., 2014). Dans le blastocyste murin, l'immunomarquage de 5hmC a révélé une quantité plus importante de cette marque épigénétique dans l'ICM par rapport au trophectoderme (Ruzov et al., 2011). En général, la 5hmC est associé à l'état pluripotent des cellules au cours du développement. La protéine TET1 s'exprime dans l'ICM et régule la

spécification des cellules du blastocyste en cellules de l'ICM : l'invalidation de son gène favorise une différenciation de ces cellules en trophectoderme (Ito et al., 2010). De manière intéressante, le taux d'hydroxyméthylation est plus élevé dans le syncytiotrophoblaste humain par rapport au cytotrophoblaste (Fogarty et al., 2015). Le niveau de la méthylation de l'ADN s'avère, au contraire, plus élevé dans le cytotrophoblaste, de manière concordante avec une augmentation de l'expression protéique de DNMT1 et DNMT3a.

Ces données soulignent l'importance de la méthylation de l'ADN dans la différenciation du lignage tropoblastique même si cette marque est peu représentée dans ce tissu. Le rôle et les conséquences éventuelles de perturbations de l'hydroxyméthylation dans cet organe restent à determiner.

2-4-2) Modifications des histones

Contrairement à la méthylation de l'ADN, les marques des histones ont été moins étudiées dans le placenta, en particulier *in vivo*. Néanmoins, il est admis que certaines marques sont spécifiques aux deux premières lignées du blastocyste (Rugg-Gunn, 2012). Le **trophectoderme** murin semblerait dépourvu, au niveau global, des marques H3K4me, H3K27me et H4K16ac, par rapport à **l'ICM** (Rugg-Gunn, 2012; Rugg-Gunn et al., 2010; Sarmento, 2004). Dans le trophectoderme bovin, les modifications de l'histone H3 ont été identifiées au niveau du promoteur du gène *Nanog homeobox*, impliqué dans le maintien de la pluripotence. Dans l'ICM, son promoteur est enrichi en modifications activatrices (H3K4me3, H3K9ac), tandis que dans le trophectoderme, le niveau des marques inhibitrices (H3K27me3, H3K9me3) est plus élevé que dans l'ICM. Ces marques épigénétiques spécifiques correspondent à un contrôle de l'activité transcriptionnelle de ce gène : *Nanog* est exprimé dans l'ICM et pratiquement indétectable dans le trophectoderme (Herrmann et al., 2013). Au stade blastocyste, la lysine méthyltransférase ***Kmt1a*** (*Suv39h1*, suppressor of variegation 3-9 homolog 1), responsable de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (**H3K9me**), s'exprime plus fortement dans le trophectoderme par rapport à l'ICM. Les promoteurs des gènes spécifiques du développement de l'embryon, dont l'expression est réprimée dans le trophoblaste, sont enrichis à la fois pour cette marque répressive H3K9me, et pour la protéine Kmt1a (Alder et al., 2010). **La méthylation des histones peut ainsi réprimer sélectivement des gènes au cours de la différenciation du trophoblaste.**

L'histone méthyltransférase **Kmt6a** (EZH2, enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit), membre d'un groupe des protéines répressives Polycomb, s'exprime au

cours du développement précoce murin (O'Carroll et al., 2001). L'invalidation de *Kmt6a* est létale chez la souris : les embryons présentent un retard du développement et ne survivent pas au-delà de l'implantation. Une expansion des tissus extraembryonnaires est observée chez les embryons *Kmt6a*$^{-/-}$. Le développement des blastocystes *Kmt6a*$^{-/-}$ *in vitro* montre que ce gène est indispensable pour la croissance de l'ICM et du trophectoderme. L'invalidation du gène codant une autre histone méthyltransférase, **Kmt1c** (Ehmt2, euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 / G9a), provoque également un arrêt de croissance des embryons et leur mort vers E11.5 (Tachibana et al., 2002). De manière intéressante, des défauts de fusion chorio-allantoïque sont observés chez les embryons *Kmt1c*$^{-/-}$. **L'activité des histones méthyltransférases jouerait ainsi un rôle dans le développement des tissus extraembryonnaires.**

Chez l'homme, des **différences existent entre le syncytiotrophoblaste et les cytotrophoblastes, en termes de marques des histones** (Fogarty et al., 2015). Les niveaux de H3K27me3 et H3K9me3, marques répressives, sont plus élevés dans les cytotrophoblastes, tandis que le niveau de H3K20me3 est plus élevé pendant les 2 premiers trimestres de grossesse, dans le syncytiotrophoblaste par rapport aux cytotrophoblastes.

Les histones désacétylases **Hdac1**, **Hdac2** et **Hdac3** sont exprimées au cours du développement murin. La Hdac1 est présente dans le blastocyste (dans l'ICM et le trophectoderme) et par la suite, tout au long de la gestation, dans les tissus embryonnaires et dans le placenta, surtout dans les cellules trophoblastiques géantes. L'invalidation de *Hdac1* provoque un défaut de formation de l'allantoïde, ainsi qu'un retard de développement à E9.5, et ainsi la létalité embryonnaire à E10.5 (Lagger et al., 2002). Dans cette étude, l'information sur le niveau de l'acétylation dans le trophoblaste mutant est absente. ***Hdac1*** **pourrait être impliquée dans l'altération de l'épigénome placentaire** avec des conséquences sur le phénotype placentaire et sur la survie embryonnaire.

La **lysine acétyltransférase *Clock*** (*Kat13d*), régulateur principal des rythmes circadiens, est exprimée dans le placenta chez la souris. De plus, son expression augmente en fin de gestation (Ratajczak et al., 2010). Cette enzyme pourrait **réguler l'expression génique dans le placenta de façon cyclique**, en augmentant le niveau de l'acétylation des histones (Waddell et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats atteste une **implication des modifications post-traductionnelles des histones** (méthylation, acétylation), ainsi que des enzymes qui régulent

ces processus épigénétiques, **dans le développement placentaire et la différenciation de ses lignées cellulaires.**

2-5) Influence de l'obésité maternelle sur le fonctionnement du placenta

Un fonctionnement placentaire normal pendant la grossesse est nécessaire pour le développement fœtal. Or, la littérature fait état de l'influence du régime alimentaire ou de l'obésité maternelle, à la fois sur son développement et son fonctionnement (Tableau 1, Article 5 Panchenko et al., 2015).

2-5-1) Effet de l'obésité sur la morphologie du placenta

Tout d'abord, les études chez l'homme et les rongeurs attestent de l'impact de l'obésité sur la croissance placentaire. Une étude australienne rapporte que le **poids placentaire** et le poids à la naissance des enfants sont plus élevés chez les patientes obèses non-diabétiques que chez les femmes avec un IMC normal (Hastie and Lappas, 2014). Chez le rat, les femelles obèses présentent également un placenta plus lourd (Borengasser et al., 2014b). A contrario, dans certaines études chez l'homme ou la souris, le poids placentaire n'est pas altéré par l'obésité maternelle (King et al., 2013b; Mele et al., 2014).

La **structure du placenta** murin peut être altérée en cas d'obésité chronique : l'épaisseur du labyrinthe est diminuée à E15.5 et E17.5, alors que celle de la décidue maternelle est augmentée après 8 semaines d'exposition au régime HFD (Kim et al., 2014). Dans une autre étude avec une période plus courte d'application du régime, uniquement au cours de la gestation, le poids placentaire est augmenté d'environ 7% chez les fœtus mâles et femelles (Gallou-Kabani et al., 2010). Cependant, la morphologie placentaire n'est pas altérée (Gabory et al., 2012). L'effet du régime sur la taille, le poids et la structure du placenta peut donc être différent selon le modèle animal utilisé et la durée d'exposition au régime.

Dans une étude prospective sur environ 40000 femmes aux Etats-Unis, l'obésité maternelle a été associée à de nombreuses **lésions placentaires** : immaturité et insuffisance placentaire, thromboses vasculaires, micro-infarctus des villosités et infiltration par des cellules immunitaires (Huang et al., 2014). Chez le macaque, le régime hyperlipidique maternel avant et pendant la grossesse altère considérablement **l'hémodynamique placentaire**, ce qui

provoque des zones d'infarctus ainsi qu'une inflammation placentaire. Cela se traduit par l'augmentation du risque de mort à la naissance (Frias et al., 2011).

En raison d'une demande élevée en énergie pour son développement et son fonctionnement, les cytotrophoblastes placentaires contiennent beaucoup de mitochondries. L'activité de la chaine respiratoire, la biogenèse des mitochondries et, par conséquent, la production de l'ATP sont très fortement diminuées dans le placenta des femmes obèses (Hastie and Lappas, 2014; Mele et al., 2014). De plus, une réduction de l'expression de gènes impliqués dans la dynamique de la fusion mitochondriale est observée dans le placenta des rats obèses (Borengasser et al., 2014b). **Des altérations de l'activité mitochondriale dans le placenta pourraient influencer son fonctionnement et, par conséquent, le développement du fœtus.**

2-5-2) Obésité et état lipotoxique et inflammatoire dans le placenta

Chez la femme obèse, **l'accumulation des lipides**, dans le mésenchyme des villosités et dans le syncytiotrophoblaste, est plus élevée que chez la femme ayant un IMC normal (Saben et al., 2014). L'étude du transcriptome a révélé une altération de l'expression des gènes, impliqués dans l'angiogenèse, le métabolisme lipidique, la signalisation cellulaire hormonale et l'inflammation par un **environnement lipotoxique placentaire**. Chez le lapin, le régime HFD chronique provoque une accumulation des lipides dans le trophoblaste dès les stade blastocyste qui se maintient tout le long de la gestation (Tarrade et al., 2013).

Une augmentation du **stress oxydatif** est également observée dans le placenta des femmes obèses (Mele et al., 2014). Chez la souris, le diabète gestationnel, induit par un régime HFD, provoque également le stress oxydatif au niveau du placenta (Liang et al., 2010). Dans ce cas, le nombre de cellules trophoblastiques est diminué. De plus, une nécrose de l'endothélium des vaisseaux fœtaux a été observée dans le labyrinthe de ces souris.

L'obésité est associée avec un **état inflammatoire** dans le placenta, chez l'homme et chez la souris. Dans une petite cohorte, une infiltration massive par des macrophages $CD68^+$ et $CD14^+$ est observée dans le mésenchyme des villosités placentaires chez les femmes obèses. De plus, le poids placentaire, le poids de naissance des enfants et leur adiposité sont plus élevés chez ces patientes en comparaison avec des patientes contrôles (Challier et al., 2008). Dans le placenta murin, l'infiltration par les macrophages et l'activation des cytokines sont également provoquées par l'obésité maternelle (Kim et al., 2014).

2-5-3) L'obésité et le transport placentaire des macronutriments

L'obésité maternelle impacte fortement le transport des nutriments à travers le placenta et donc leur disponibilité pour le fœtus. Plusieurs études montrent **l'effet de l'obésité sur les transporteurs des macronutriments** chez l'homme ou la souris (Tableau IV, Annexes) (Brett et al., 2014). Dans les placentas des femmes obèses, l'expression protéique et le taux d'ARNm des **transporteurs des AG** sont dérégulés, ainsi que l'activité enzymatique de la lipoprotéine lipase placentaire (Dube et al., 2012). Ces altérations du transport placentaire sont associées à une augmentation du poids placentaire. Néanmoins, le poids fœtal n'est pas modifié dans cette étude, bien que le niveau du cholestérol des nouveau-nés des femmes obèses soit élevé.

Concernant les **transporteurs des acides aminés**, le régime HFD provoque une augmentation de l'expression des gènes codants les membres du système A, *Slc38a2* (solute carrier family 38, member 2 / *Snat2*) et de *Scl38a4* (solute carrier family 38, member 4 / *Snat4*) dans le labyrinthe murin à E14.5 (King et al., 2013b). Toutefois, leur expression est restaurée à E18.5, supposant que des processus d'adaptation se mettent en place dans le placenta. Dans un modèle d'obésité maternelle, induite par le régime hyperlipidique et hypersucré, l'expression protéique de GLUT1, GLUT3, SLC38a2 et SLC7a5 (Lat1, large neutral amino acid transport 1) est augmentée dans les membranes plasmatiques du trophoblaste à E18.5 (Rosario et al., 2015) (Tableau IV, Annexes). Par conséquent, le transport des acides aminés est plus actif chez les femelles obèses, ce qui est probablement en cause dans l'augmentation du poids fœtal de 18% par rapport aux souris sous régime contrôle. Chez les patientes obèses, le niveau protéique de SLC38a4 est diminué dans le syncytiotrophoblaste, ce qui est associé à une diminution du passage des acides aminés (Tableau IV, Annexes) (Farley et al., 2010). Dans cette étude, le poids fœtal et placentaire n'est pas altéré. Une étude révèle qu'il y a une corrélation positive entre l'expression de la protéine GLUT1 à la membrane basale du syncytiotrophoblaste et un poids de naissance élevé chez les enfants des femmes obèses, mais normoglycémiques (Acosta et al., 2015). Dans cette cohorte de femmes obèses, le poids à la naissance est augmenté, ainsi que celui des placentas. Chez la souris sous régime hyperlipidique, les protéines GLUT1 et SLC38a2 sont plus exprimées à la surface membranaire microvilleuse du syncytiotrophoblaste (Jones et al., 2009). Selon une expérience avec un marquage radioactif *in vivo*, cette augmentation des transporteurs aboutit à un **transport augmenté du glucose et des acides aminés** vers le placenta et le fœtus. Ces résultats sont en accord avec le poids élevé à E18.5 des fœtus des mères obèses (Jones et al., 2009).

L'obésité maternelle a des effets importants sur la morphologie et le fonctionnement du placenta. Des altérations de la fonction nutritionnelle du placenta mènent à une modification de l'apport des nutriments, et impactent ainsi la croissance et la composition corporelle du fœtus chez l'homme et chez la souris (Godfrey, 2002).

2-5-4) Réponses différentes à l'environnement maternel obésogène dans les placentas des fœtus mâles et femelles

Des récentes données suggèrent que le placenta n'est pas un organe "asexué" (Clifton, 2010; Gabory et al., 2013; Tarrade et al., 2015). En tant qu'organe extra-embryonnaire, il présente le **même sexe que celui de l'embryon**. L'expression du **transcriptome est spécifique du sexe** dans le placenta humain chez les sujets sains (Sood et al., 2006). Les gènes différentiellement exprimés entre mâles et femelles sont impliqués dans plusieurs fonctions : la sécrétion par des cellules trophoblastiques, des voies de transduction du signal, le métabolisme, la régulation immunitaire, la structure et l'adhésion cellulaire.

Dans le cas de l'exposition au régime HFD chez le lapin, le stockage des lipides est plus élevé dans les placentas des femelles, alors que dans le placenta des mâles c'est le niveau des TG qui est augmenté (Tarrade et al., 2013). Ces différentes stratégies adaptatives au régime alimentaire maternel, pourraient expliquer le dimorphisme sexuel observé en termes de profil lipidique plasmatique fœtal : une hypercholestérolémie et un niveau élevé des AG libres chez les mâles, mais une absence de dyslipidémie chez les femelles. **L'adaptation placentaire semblerait protéger les fœtus femelles de l'hyperlipidémie maternelle.**

Dans une autre étude, la consommation de fructose chez les rattes, pendant la gestation et les 10 premiers jours de la lactation, a provoqué une diminution du poids placentaire, ainsi qu'un niveau élevé de fructose plasmatique, uniquement chez les fœtus femelles (Vickers et al., 2011). **Les femelles s'avèrent ainsi plus vulnérables au régime hypersucré *in utero*.**

Quelques d'études éclaircissent le lien entre régime HFD ou obésité maternelle et expression génique. Chez la souris, un **régime maternel riche ou pauvre en lipides altère l'expression génique dans le placenta** à E12.5, avec un effet plus important dans celui des fœtus femelles (Mao et al., 2010). La supplémentation des femmes enceintes en AG oméga-3 à longue chaîne provoque une réponse du transcriptome placentaire différent selon le sexe : le nombre de gènes différentiellement exprimés est plus élevé chez les filles (Sedlmeier et al., 2014).

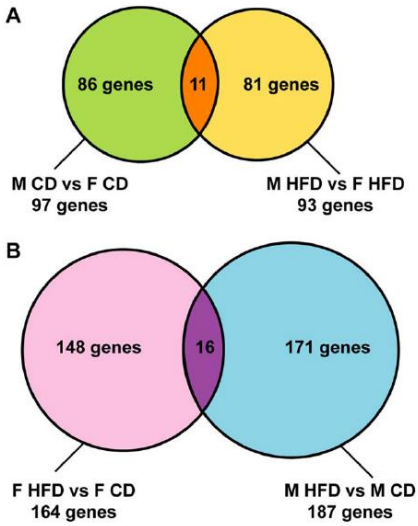


Figure 41. Dimorphisme sexuel et effet du régime maternel hyperlipidique pendant la gestation sur l'expression génique dans le placenta murin à E15.5

(A) Dimorphisme sexuel de l'expression génique placentaire sous régime contrôle (CD) ou hyperlipidique (HFD).

(B) Effet du régime HFD maternel sur l'expression génique dans les placentas des mâles ou des femelles.

M – mâles, F – femelles.

Adapté de Gabory et al., 2012

Le régime HFD, appliqué pendant les 15 premiers jours de la gestation, altère le transcriptome placentaire (Gabory et al., 2012). **Les gènes dérégulés par ce régime, dans leur grande majorité, ne sont pas les mêmes dans les placentas des mâles et dans ceux des femelles** (Figure 41). Les fonctions associées à ces gènes dérégulés en réponse au régime sont également différentes : chez la femelle, ils sont associés à la réponse immunitaire, au métabolisme des monoamines et des acides aminés, alors que chez le mâle la réponse concerne des gènes impliqués dans le développement et la fonction vasculaire, le métabolisme glucidique et lipidique.

Selon ces études, **des fœtus de sexe différent développeraient différentes stratégies de survie en réponse à l'environnement maternel défavorable et le placenta serait le médiateur de cette adaptation** (Clifton, 2010). La théorie prédominante dans la littérature suggère que les femelles présenteraient de nombreuses adaptations de niveau d'expression génique dans le placenta, aboutissant à une meilleure survie. En revanche, l'adaptation placentaire semblerait moins prononcée pour les fœtus mâles, avec un risque plus élevé de conséquences négatives en termes de survie ou de développement de maladies. Les stratégies pourraient varier selon le type de facteur environnemental, l'espèce, la durée et la période d'exposition. De nouvelles études aideraient à appréhender les mécanismes du dimorphisme sexuel de l'adaptation placentaire à l'environnement maternel.

2-6) Rôle du placenta dans le conditionnement de la santé de l'individu

2-6-1) Conséquences de l'altération du fonctionnement placentaire sur la santé à long terme

Une altération du développement placentaire par la physiologie de la mère pourrait vraisemblablement avoir un effet à long terme sur la progéniture (Godfrey, 2002). Le placenta a une **capacité considérable d'adaptation métabolique afin d'assurer la croissance normale du fœtus**, mais s'il atteint ses limites de plasticité, le fœtus peut être exposé à l'environnement maternel néfaste, avec comme conséquence une prédisposition accrue aux pathologies à long terme.

Un poids placentaire, trop petit, ou au contraire, trop important peut prédisposer l'individu à l'hypertension, aux maladies coronariennes et au diabète de type 2 (Godfrey,

2002). Par exemple, dans une étude sur une cohorte de 2571 hommes, nés entre 1907 et 1930 au Royaume-Uni, le lien entre croissance placentaire et mortalité due à une maladie coronarienne à l'âge adulte a été établi (Godfrey, 2002). Ces résultats ont été confirmés dans une cohorte norvégienne plus large (Risnes et al., 2009). Le risque d'insuffisance cardiaque chronique à l'âge adulte est associé à une surface placentaire plus petite (Barker et al., 2010). Le petit poids placentaire est également associé à une hypertension et au diabète (Eriksson et al., 2000). En effet, le développement cardiaque correct dépend de la fonction vasculaire du placenta, et plus précisément, de la résistance des vaisseaux (Thornburg et al., 2010).

Dans la littérature, rares sont les preuves quant à l'influence du fonctionnement placentaire sur d'autres paramètres à l'âge adulte. Selon une étude chez le rat, **l'obésité maternelle**, provoquée par un régime hypercalorique, induit une **augmentation du poids placentaire** et de l'expression de gènes impliqués dans la **biogenèse mitochondriale** dans le labyrinthe. Chez les descendants mâles nés de mères obèses, la **susceptibilité accrue de développer l'obésité** est révélée à l'âge adulte (Borengasser et al., 2014b). Dans une autre étude chez le rat, une carence en protéines pendant la période périconceptionnelle provoque une diminution du nombre des cellules du trophectoderme à E4.25 (Kwong et al., 2000). Les effets sur la croissance post-natale des descendants ont été étudiés : les descendantes femelles ont un poids de naissance diminué par rapport aux femelles nées des mères contrôles, mais elles rattrapent ce retard de croissance vers la 7ème semaine de vie. La pression systolique et le poids du foie et des reins sont altérés chez les descendants mâles des mères sous-nourries (Kwong et al., 2000). Cette programmation développementale par la nutrition maternelle serait médiée par des altérations de la lignée trophoblastique. Une étude approfondie du phénotype placentaire confirmerait cette hypothèse.

Ces études démontrent l'association entre les altérations placentaires et une prédisposition à développer des maladies après la naissance. Concernant les mécanismes de ce phénomène, des perturbations de transfert des nutriments ou de l'oxygène au fœtus pourraient compromettre sa croissance et la morphogenèse des organes. **Les changements irréversibles de la structure des organes fœtaux, affectant leur fonction, auraient des conséquences sur la santé de la descendance**.

2-6-2) Mécanismes épigénétiques de la DOHaD dans le placenta

Les mécanismes épigénétiques de la programmation développementale dans le placenta sont encore peu connus à ce jour. Selon une hypothèse actuelle, l'environnement délétère

maternel impacterait l'expression des gènes clés du développement, via des altérations de l'épigénome placentaire. Une fois le développement placentaire altéré, la croissance modifiée du fœtus serait un facteur prédisposant au développement de maladies chroniques plus tardivement (Lee and Ding, 2012; Tarrade et al., 2015).

Certaines études chez l'homme montrent le lien entre **l'obésité, le diabète et la méthylation de l'ADN**. Une augmentation de la méthylation de CpG situés dans le promoteur de la leptine (2,5%) est observée dans le placenta des femmes diabétiques (Lesseur et al., 2014). Le niveau de récepteur à la leptine est réduit dans le syncytiotrophoblaste chez les femmes obèses (Farley et al., 2010). La leptine étant impliquée dans le transport des nutriments, l'angiogenèse, la prolifération du trophoblaste et l'immunomodulation placentaire, une résistance à son action pourrait avoir des répercussions sur le développement fœtal (Tessier et al., 2013). Dans une autre cohorte, la méthylation du promoteur de la leptine dans le placenta présente une faible corrélation avec la glycémie chez des femmes intolérantes au glucose pendant la grossesse (Bouchard et al., 2010). Toutefois, les conséquences des altérations de la méthylation de la leptine dans le placenta pour les descendants ne sont pas encore élucidées.

Le **diabète gestationnel** altère la méthylation de l'ADN au niveau pangénomique dans le placenta chez l'homme, où 1708 régions avec une différence en taux de méthylation d'au moins 5% par rapport aux placentas contrôles sont identifiées (Finer et al., 2015). Les fonctions des régionsdifférentiellement méthylées sont liées à l'endocytose, la voie de signalisation des MAPK kinases et de l'insuline. Dans une autre cohorte, 3271 gènes sont différentiellement méthylés dans les placentas de femmes diabétiques. L'analyse des fonctions altérées a montré que ces gènes sont impliqués dans des maladies métaboliques, cardiovasculaires et psychologiques. De manière intéressante, 326 gènes, représentant 10% des gènes dérégulés, sont corrélés au poids de naissance (Ruchat et al., 2013).

Une restriction calorique, pendant la gestation chez la souris, provoque une hyperméthylation d'un îlot CpG dans le promoteur de *Glut3,* ce qui est lié à une diminution de l'expression de ce gène dans le placenta (Ganguly et al., 2014). La fixation de MeCP2, protéine qui reconnait l'ADN méthylé, à cet îlot CpG est augmentée, ce qui est en accord avec le recrutement de HDAC2 (Tableau III, Annexes). Chez ces femelles, le transport de glucose dans le placenta et le poids fœtal et placentaire sont diminués (Ganguly et al., 2012).

Les mécanismes épigénétiques sont impliqués dans la **programmation de l'axe corticotrope** par le stress maternel. Le niveau des glucocorticoïdes maternels peut prédisposer

à la réponse au stress de l'axe corticotrope et induire des perturbations émotionnelles chez les descendants (Togher et al., 2014). Le placenta assure la protection du fœtus contre un niveau élevé de cortisol grâce à la **11βHSD2** (hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2), qui s'exprime dans le syncytiotrophoblaste et le transforme en forme inactive, la cortisone. La régulation épigénétique de l'expression de la *11βHsd2* est connue dans le placenta : l'hyperméthylation de son promoteur en cas de stress prénatal est médiée par la ***Dnmt3a*** (Jensen Peña et al., 2012; Togher et al., 2014). Ceci est associé avec l'expression réduite de *11βHsd2*, supposant une exposition plus forte du fœtus aux glucocorticoïdes. Dans l'hypothalamus fœtal, le niveau de la méthylation de *11βHsd2* est altéré, ce qui pourrait avoir des conséquences neurobiologiques plus tard dans la vie. Dans le placenta humain à terme, une lysine acétyltransférase **KAT3b** (p300, E1A binding protein p300) s'exprime dans les noyaux du syncytiotrophoblaste (Tableau III, Annexes) (Li et al., 2013). La KAT3b se lie au promoteur de *11βHsd2* dans les cellules trophoblastiques humaines en culture. En parallèle, le niveau de l'acétylation de H3K9 et H3K27 augmente au cours de la formation du syncytiotrophoblaste. Les expériences d'invalidation ou de surexpression de *Kat3b* prouvent que l'expression de *11βHsd2* est régulée par cet enzyme. Les modifications des histones seraient ainsi impliquées dans le fonctionnement de la barrière contre les glucocorticoïdes maternels.

Il existe un lien entre l'état émotionnel de la mère au cours de la grossesse, la **méthylation de *11βHsd2* et du *GR* dans le placenta** et le comportement neurologique chez un nouveau-né. La **dépression maternelle** provoque une hyperméthylation au niveau d'un CpG spécifique de *GR*, tandis que **l'anxiété maternelle** mène à une hyperméthylation d'un CpG de *11βHsd2* (Conradt et al., 2013). Différents paramètres du **comportement du nouveau-né** (autorégulation, hypotonie, léthargie) sont associés aux niveaux de méthylation de ces deux gènes dans le placenta (Tableau III, Annexes).

Dans un modèle de **régime HFD**, appliqué pendant les premiers 15 jours de la gestation, une hypométhylation globale de l'ADN est observée dans les placentas des embryons femelles (Gallou-Kabani et al., 2010). **Une expression de certains gènes de la machinerie épigénétique est dérégulée** par le régime de la mère dans le placenta à E15.5 (Gabory et al., 2012). Tout d'abord, l'expression de ***Dnmt3l***, un cofacteur des méthyltransférases Dnmt3, est réduite, ce qui contribuerait à la diminution du niveau de la méthylation globale de l'ADN, observée dans le même modèle (Gallou-Kabani et al., 2010). En revanche, malgré une diminution de l'expression des lysines méthyltransférases ***Kmt1a*** et ***Kmt1b*** (*Suv39h1* et *Suv39h2*, suppressor of variegation 3-9 homolog 1 et 2), aucune altération du niveau global de

leur marque cible, H3K9me3, n'a été observée. Suite à une dérégulation des "*writers*" de cette marque, son niveau pourrait toutefois être altéré plus tard dans le développement. Le niveau d'expression de l'arginine méthyltransférase ***Prmt7*** (protein arginine methyltransferase 7) a été également diminué mais son rôle dans le placenta reste inconnu. La dérégulation de l'expression des gènes de la machinerie épigénétique serait ainsi à l'origine des **altérations du transcriptome placentaire**. Des études approfondies, à plusieurs stades du développement, sont nécessaires afin de démontrer le lien causal entre sensibilité de la machinerie épigénétique à l'obésité maternelle, épigénome et expression génique dans le placenta.

Pour conclure, actuellement **peu de données étayent l'hypothèse de l'implication des processus épigénétiques, dans le placenta, dans le conditionnement développemental**. Les études actuelles s'intéressent aux effets de l'état métabolique de la mère sur la méthylation de l'ADN, au niveau pangénomique ou au niveau de gènes cibles, mais peu d'information est disponible concernant les modifications des histones. L'obésité de la mère a un impact sur la morphologie et la fonction placentaires. Or, le dysfonctionnement pourrait conditionner la susceptibilité aux maladies plus tard dans la vie (Thornburg, 2015). Afin de conforter cette hypothèse et démontrer le lien de causes à effet, il est nécessaire dans un modèle animal, i) de rechercher quelles marques épigénétiques sont sensibles à l'environnement maternel dans le placenta, ii) d'établir le lien entre ces marqués spécifiques, l'expression génique et les fonctions placentaires affectées, puis iii) d'identifier les conséquences d'une altération de l'épigénome placentaire sur le devenir de la descendance à long terme. Le placenta peut être non seulement **porteur de la mémoire des évènements délétères survenus *in utero***, mais aussi **prédicteur de prédispositions aux pathologies chez l'adulte**. Il serait bien sur d'une grande utilité en médecine humaine d'indéntifier des marqueurs de l'exposition deletaire, puisque le placenta est d'acces facile pour des analyses. Ces données pourraient contribuer à l'établissement d'un suivi personnalisé des bébés puis des enfants dans un cadre de prévention.

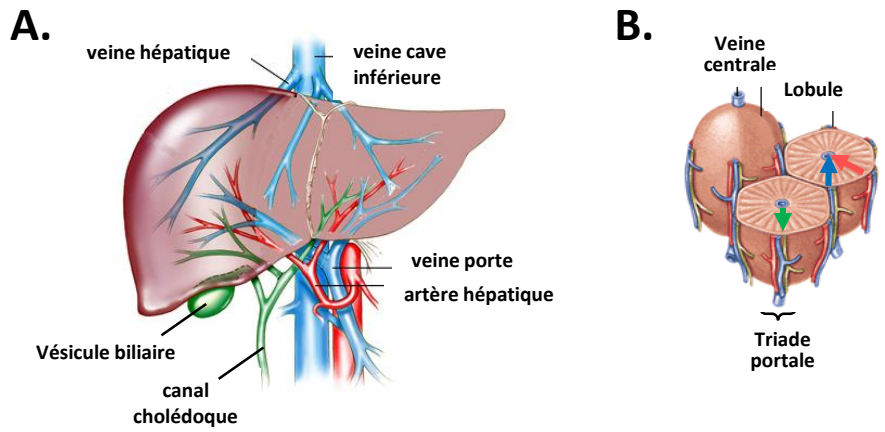


Figure 42. Circulation du sang au niveau du foie et organisation du lobule hépatique

(A) Les principaux vaisseaux sanguins du foie.

(B) L'organisation du lobule: circulation du sang et de la bile entre la veine centrale et la triade hépatique dans un lobule. Un lobule hépatique présente un hexagone avec une veine centrale au milieu et 6 triades portales à la périphérie. Le sang de l'artère (2), flèche rouge, et de la veine hépatique (3), flèche bleu, circule de la périphérie du lobule vers la veine centrale. La bile produite par les hépatocytes se dirige dans le sens inverse (flèche verte), vers les canaux biliaires (4) de la triade.

Adapté de:
https://academic.amc.edu/martino/grossanatomy/site/Medical/CASES/GI/pop%20ups/cirrhosis%20anspop_up4.htm

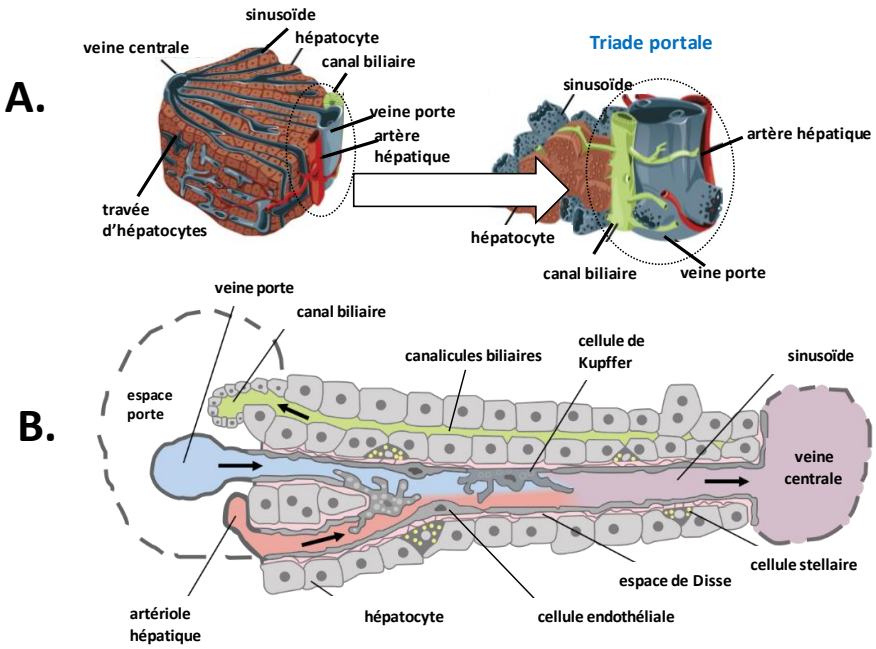


Figure 43. Structure et organisation cellulaire d'une section d'un lobule hépatique dans le foie adulte

(A) La veine centrale est au milieu du lobule hépatique. Des sinusoïdes séparent les travées d'hépatocytes (en marron). Le triade portale, à la périphérie d'un lobe, est constitué de la veine portale terminale (en bleu), de l'artère hépatique terminale (en rouge) et d'un canal biliaire (en vert). (Adapté de Si-Tayeb et al., 2010)

(B) Des hépatocytes sont en contact étroit grâce à la présence de jonctions serrées. Les étroits canalicules biliaires sont formés par les hépatocytes permettant le passage de la bile vers les canaux biliaires. Les sinusoïdes hépatiques sont formés par les cellules endothéliales qui forment une couche discontinue. L'espace de Disse permet l'échange de métabolites entre les hépatocytes et le sang. Les cellules stellaires se trouvent dans cet espace et contiennent des gouttelettes lipidiques stockant la vitamine A. Les macrophages spécifiques du foie, cellules de Kupffer, se trouvent dans les sinusoïdes. Le sang se dirige de l'espace porte vers une veine centrale.

Adapté de Frevert et al., 2005

3) Le foie

3-1) Morphologie et organisation fonctionnelle du foie à l'âge adulte

Le foie est le plus grand organe viscéral de l'organisme. Il assure de nombreuses fonctions vitales, métaboliques, exocrines et endocrines, afin de maintenir l'homéostasie.

Deux vaisseaux apportent le sang au foie : **l'artère hépatique** et **la veine porte** (Figure 42A). L'artère amène le sang oxygéné provenant du cœur, tandis que la veine porte convoie le sang riche en nutriments provenant de l'intestin, mais pauvre en oxygène. Après son passage à travers le foie dans un plexus complexe de sinusoïdes, le sang provenant des veines hépatiques retourne vers le cœur par la veine cave.

L'unité fonctionnelle du tissu hépatique est le **lobule** : celui-ci est constitué de travées d'hépatocytes, cellules métaboliques du foie, qui sont séparées par les sinusoïdes capillaires (Figure 43A). Le lobule, au centre duquel se trouve une veine centrale, est de forme hexagonale. Dans chacun de ces 6 coins se trouve une **triade portale**, contenant des branchements d'une veine portale, d'une artère hépatique et d'un ductule (canal) biliaire (Figures 42B et 43A) (Si-Tayeb et al., 2010). Le sang issu des branches de l'artère et de la veine converge dans les **sinusoïdes**, formées par une couche fenestrée de cellules endothéliales. La perméabilité des sinusoïdes permet les échanges de métabolites entre le sang et les hépatocytes dans **l'espace de Disse** (Figure 44)**.** La composition du sang se modifie au fur et à mesure de son passage de la périphérie du lobule vers la veine centrale. Finalement, le sang détoxifié est évacué par la veine centrale du lobule.

Les **hépatocytes**, le type cellulaire prédominant du foie, constituent chez le rat environ 78% de la masse hépatique à l'âge adulte (Blouin et al., 1977). Ces cellules ont un ou deux noyaux qui peuvent être polyploïdiques (tétra- ou octoploïdiques) (Gentric and Desdouets, 2014). La partie basale des hépatocytes, en contact avec le sang des sinusoïdes, assure la **détoxication et la fonction métabolique**. L'hépatocyte modifie la composition du sérum : il capte et métabolise certaines substances et en sécrète d'autres. Sa partie apicale **sécrète la bile** qui est transportée par les canalicules biliaires, formés par des invaginations de la membrane des hépatocytes, vers les canaux biliaires de la triade portale (Figure 44). La fonction des hépatocytes dépend de leur position dans le lobule (Beath, 2003). La majorité des fonctions

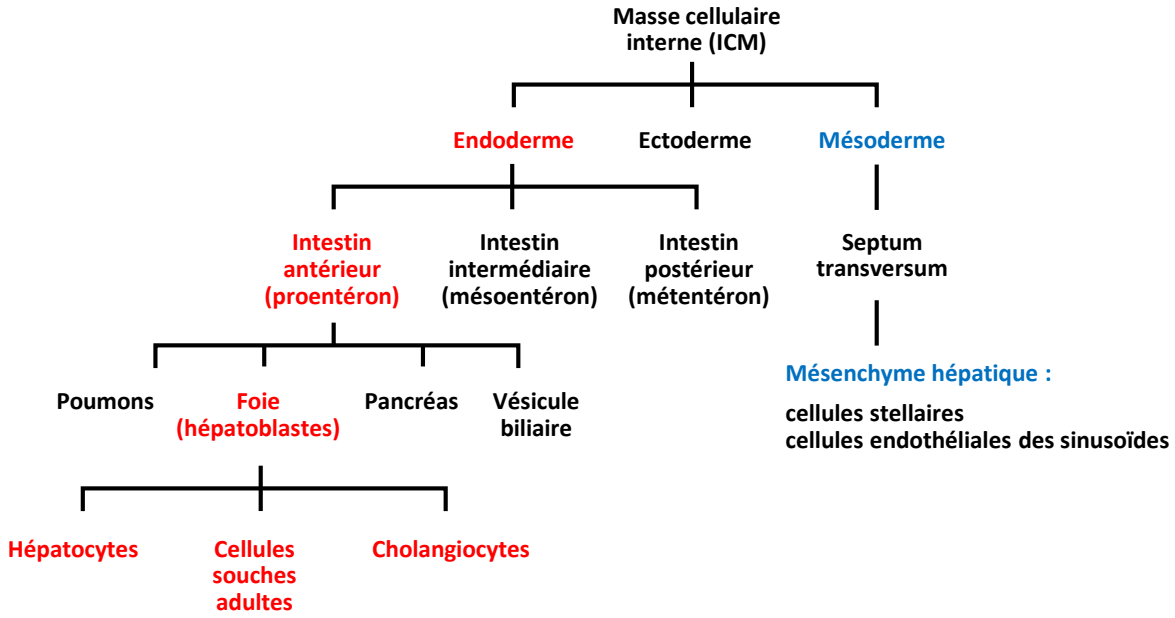


Figure 44. La différenciation des lignages cellulaires hépatiques chez la souris

Les hépatocytes, les cholangiocytes et les cellules souches hépatiques proviennent de l'endoderme (en rouge), tandis que les cellules mésenchymateuses du foie proviennent du mésoderme (en bleu).

Adapté de Zorn et Wells, 2009; Crawford et al., 2010

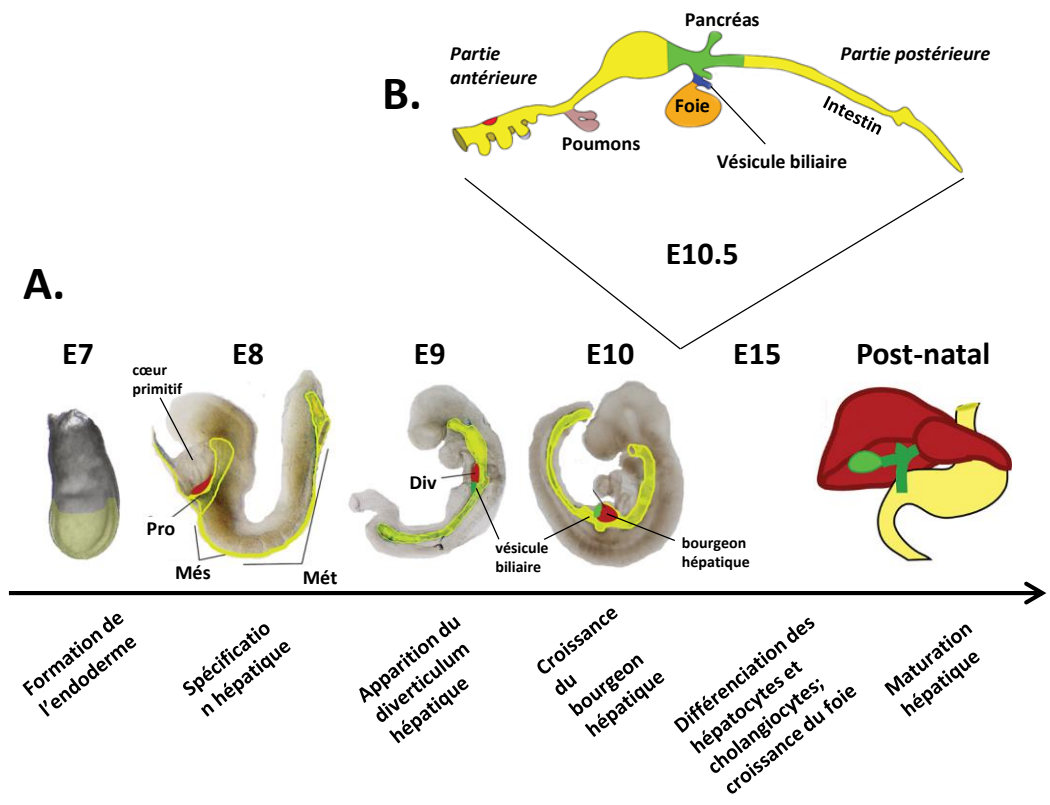


Figure 45. Morphogenèse hépatique chez la souris

(A) L'endoderme (en jaune) se forme à partir de E7 et se spécifie en proentéron (Pro), mésoentéron (Més) et métentéron (Mét) à E8. La différentiation hépatique (en rouge) commence à partir de E8 sous les signaux cellulaires provenant du mésoderme. A E9 le diverticulum hépatique (Div) apparaît, qui donnera d'une part le foie et d'autre part la vésicule biliaire (en vert). Sa croissance le transformera en bourgeon hépatique vers E10. Ensuite, le foie augmente en taille et les hépatoblastes se différencient en hépatocytes et les cholangiocytes. La maturation hépatique est progressive et se termine après la naissance.

(B) Représentation schématique du tractus digestif à E10.5. Le bourgeon hépatique est en orange, le bourgeon biliaire est en bleu et le pancréas dorsal et ventral est en vert. E – jour embryonnaire.

Adapté de Zorn et Wells, 2009

métaboliques est assurée par les hépatocytes à proximité de l'espace porte, où se trouve la triade portale et où les échanges des métabolites sont les plus intenses. Les hépatocytes proches de la veine centrale assurent la détoxification du sang.

D'autres types cellulaires assurent les fonctions hépatiques : les cellules stellaires et les cellules de Kupffer. Les **cellules stellaires**, aux prolongements dendritiques, se trouvent dans l'espace de Disse. Ces cellules stellaires, stockant la vitamine A dans des gouttelettes lipidiques, sont impliquées dans la contraction et la dilatation des sinusoïdes, dans la fonction immunitaire hépatique et dans la maintenance de la matrice extracellulaire (Weiskirchen and Tacke, 2014). Les **cellules de Kupffer**, macrophages spécifiques du foie, sont fixées aux cellules endothéliales des sinusoïdes par leurs pseudopodes (Figure 43B). Impliquées dans la fonction immunologique, elles phagocytent les globules rouges, les bactéries et les débris cellulaires (Naito et al., 1997).

L'architecture cellulaire complexe du foie, nécessaire pour assurer de nombreuses fonctions, se construit progressivement au cours du développement. **Des perturbations de la morphogenèse hépatique peuvent avoir à long terme des répercussions sur la santé.** Pour mieux comprendre ces processus, le développement du foie *in utero* est décrit ci-dessous.

3-2) Développement du foie *in utero*

Le processus d'organogenèse hépatique, très conservé au cours de l'évolution, est mieux étudié chez la souris. L'organisation au niveau cellulaire et morphologique du foie se met progressivement en place à partir de E8-9 et continue au début de la vie postnatale.

Le **foie provient de l'endoderme**, feuillet interne de l'embryon, formé pendant la gastrulation à E6.5-E7.5 (Zorn and Wells, 2009) (Figure 44). L'endoderme forme le tube intestinal primitif qui a 3 zones distinctes: l'intestin antérieur (proentéron ou *foregut*), intermédiaire (mésentéron ou *midgut*) et postérieur (métentéron ou *hindgut*) ((Crawford et al., 2010; Zorn and Wells, 2009) (Figure 44, Figure 45).

A E8, la partie de proentéron, qui est en contact avec le cœur primitif, reçoit des signaux cellulaires du mésenchyme du septum transversum (septum transversum mesenchyme, STM). Des facteurs de transcription ou de croissance, sécrétés par le mésoderme (le cœur primitif, le STM et les cellules endothéliales), entrainent la différenciation des **hépatoblastes**, les cellules endodermales progénitrices hépatiques, et la formation du diverticulum hépatique (Figure 45) (Zorn and Wells, 2007). Sa partie antérieure formera le foie et le système biliaire intrahépatique,

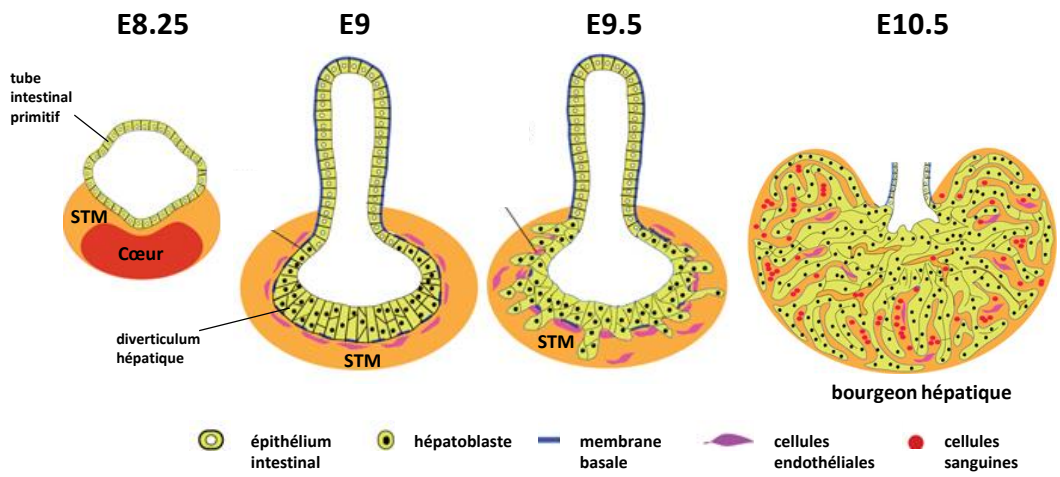


Figure 46. Vue transversale de la formation du bourgeon hépatique au cours du développement murin

La morphogenèse hépatique est induite par des signaux produits par la STM, le cœur primitif et les cellules endothéliales tout au long du développement. A 8.3, le tube intestinal primitif est en contact avec le cœur primitif, permettant ainsi l'induction du développement hépatique. A E9 le diverticulum hépatique est séparé du mésenchyme du septum transversum (*septum transversum mesenchyme*, STM) par une membrane basale riche en laminine, avec une présence des précurseurs des cellules endothéliales. La rupture de la membrane basale a lieu à E9.5, permettant aux hépatoblastes de migrer dans la STM afin de former le bourgeon hépatique vers E10.5.

E – jour embryonnaire, STM - septum transversum.

Adapté du site *http://www.stembook.org/node/512#*

tandis que la partie postérieure formera la vésicule biliaire et le système biliaire extra-hépatique (Crawford et al., 2010) (Figure 45). Le diverticulum hépatique est séparé du STM par la membrane basale riche en laminine (Figure 46).

À E9.5, la membrane basale est rompue et les hépatoblastes envahissent le STM, en formant le bourgeon hépatique, visible vers E10. Ce bourgeon hépatique, situé alors au milieu du corps de l'embryon, est constitué d'hépatoblastes, organisés en travées, et de sinusoïdes qui se trouvent entre ces travées (Crawford et al., 2010) (Figure 46). Ces sinusoïdes de type capillaire sont formées par des cellules endothéliales issues des veines vitellines. Les **cellules mésenchymales** hépatiques (cellules stellaires, cellules endothéliales des sinusoïdes, fibroblastes, cellules musculaires lisses) ont une origine mésodermique, provenant de la STM (Asahina et al., 2011).

A partir d'E12.5, le foie se divise en lobes hépatiques distincts. **L'architecture hépatique dite "mature" est acquise après E14.5.** Les hépatoblastes sont des cellules bipotentes, c'est-à-dire qu'elless ont la capacité de se différencier à partir de E14.5 soit en hépatocytes, soit en cholangiocytes**,** les cellules épithéliales biliaires (Crawford et al., 2010) (Figure 44). D'une part, les hépatoblastes se trouvant à côté de la veine porte se différencient en cholangiocytes, qui ainsi formeront le lumen des canaux biliaires. D'autre part, des hépatoblastes du parenchyme sont à l'origine des hépatocytes. Le foie continue par la suite d'augmenter considérablement en volume, grâce à la prolifération des hépatocytes, à la vascularisation progressive, et à la présence de vastes niches de cellules hématopoïétiques (Crawford et al., 2010).

La maturation hépatique continue après la naissance. En post-natal, le foie conserve l'architecture anatomique caractéristique acquise vers la fin de la période fœtale. La masse hépatique augmente considérablement pendant les 3 premières semaines chez la souris. **La maturation finale est atteinte vers 2-3 semaines** au cours de l'installation définitive des systèmes d'irrigation sanguine et biliaire.

3-3) Fonction hépatique au cours du développement fœtal chez la souris et chez l'homme

3-3-1) Fonction hématopoïétique chez le fœtus

L'hématopoïèse est le processus de production et de renouvellement des cellules sanguines. Pendant le développement intra-utérin, le foie est un site majeur de l'hématopoïèse (Crawford et al., 2010). Chez la souris, l'hématopoïèse primitive débute dans les sites mésenchymateux : dans le sac vitellin à E7 et dans une région ventrale de l'aorte dorsale. Dans le cas de l'hématopoïèse primitive, les cellules souches continuent leur maturation dans la circulation sanguine.

Puis, à partir d'E11.5, les **cellules souches hématopoïétiques colonisent le foie** où a lieu leur prolifération et maturation (Crawford et al., 2010). Les premières **cellules souches hématopoïétiques** sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent produire n'importe quelle cellule hématopoïétique. Par la suite, la production des érythrocytes, l'érythropoïèse, devient prédominante dans le foie fœtal, niche pour l'énucléation des cellules érythroïdes primitives. Néanmoins, les granulocytes et les lignées lymphoïdes peuvent également être produits dans le foie.

L'hématopoïèse dans le foie est constituée de quatre phases principales (Sasaki and Sonoda, 2000):

- phase I : enclenchement de l'hématopoïèse (E10.5) ;
- phase II : expansion des cellules hématopoïétiques (E11 - E12) ;
- phase III : pic de la fonction hématopoïétique (E13.0 - E14) ;
- phase IV : début de l'atténuation de la fonction hématopoïétique (à partir de E15).

Une étude histologique a démontré qu'en phase I, les cellules souches hématopoïétiques migrent depuis les sinusoïdes et forment des **colonies parmi les hépatoblastes**, de telle manière que les travées formées par les hépatocytes deviennent irrégulières (Sasaki and Sonoda, 2000). En phase III, la surface occupée par les cellules hématopoïétiques augmente et atteint, à E14, environ 74% de la surface totale. Pendant la phase IV, cette surface commence à diminuer fortement et vers E19, il ne reste que de petits compartiments d'hématopoïèse dispersés entre

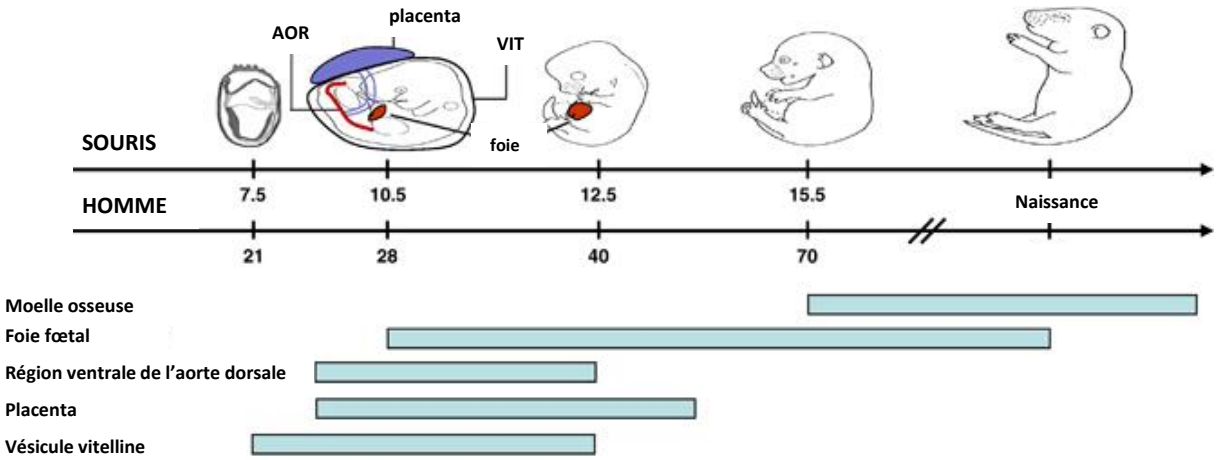


Figure 47. Les sites d'hématopoïèse au cours du développement chez la souris et chez l'homme

Les barres bleues représentent les périodes de l'hématopoïèse active.
VIT – vésicule vitelline, AOR - région ventrale de l'aorte dorsale.

Adapté de Luis et al., 2012

les travées hépatiques, permettant le rétablissement de contacts étroits entre les hépatocytes (Sasaki and Sonoda, 2000).

Au cours du développement, les autres sites prennent progressivement en charge l'hématopoïèse : le thymus à partir de E13, la rate à partir de E15 et finalement la moelle osseuse à partir de E16 (Crawford et al., 2010). Néanmoins, **le foie continue encore à contribuer à l'hématopoïèse durant la première semaine post-natale** (Crawford et al., 2010). Ensuite, l'hématopoïèse sera assurée par la moelle osseuse.

Bien que le **schéma général de l'hématopoïèse soit conservé entre l'homme et la souris**, il existe toutefois certaines différences dans le phénotype immunitaire et dans le fonctionnement des cellules souches hématopoïétiques (Luis et al., 2012) (Figure 47).

3-3-2) Installation de la fonction métabolique chez le fœtus

Pendant le développement *in utero,* les fonctions métaboliques du fœtus sont assurées grâce au foie maternel, car les métabolites et les nutriments nécessaires passent via le placenta. Parmi les nutriments apportés au fœtus, il y a une forte concentration de glucides et d'acides aminés, tandis qu'après la naissance le lait maternel apporte surtout des lipides et peu de glucides. Un nouveau-né doit ainsi **adapter son métabolisme à ce changement nutritionnel** drastique : le foie joue un rôle déterminant dans ce processus.

Afin d'assurer cette adaptation métabolique, le foie, au cours de sa morphogenèse, **acquiert progressivement sa capacité métabolique** grâce à la maturation des hépatocytes *in utero*. Chez la souris, au moment de la différenciation des hépatoblastes en hépatocytes **à E14.5, la fonction métabolique prend progressivement le relais de la fonction hématopoïétique** (Crawford et al., 2010).

Métabolisme glucidique. Chez l'homme, certaines fonctions métaboliques débutent à 2 mois de développement *in utero,* par exemple la glycolyse et la production du glycogène (Grijalva and Vakili, 2013). Les besoins du fœtus en énergie sont assurés par le glucose maternel, transporté via le placenta, afin d'être transformé en ATP par la glycolyse. La majorité des enzymes du métabolisme du glucose sont présents dans le foie fœtal humain. Le dépôt de glycogène, issu de la transformation du glucose permet de maintenir le niveau du glucose pendant les premières heures suivant la naissance (Ward Platt and Deshpande, 2005). Toutefois, la production du glucose, la néoglucogenèse, ne débute qu'après la naissance, car la

phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), enzyme clé de ce processus, ne devient active qu'après 2 heures de vie post-natales (Grijalva and Vakili, 2013).

Métabolisme lipidique. La fonction de lipolyse n'est pas encore active *in utero* chez l'homme : les triglycérides (TG) maternels sont lysés par le placenta afin de transporter les acides gras (AG) jusqu'au fœtus (Grijalva and Vakili, 2013). Le niveau de la β-oxydation des AG est faible chez le fœtus, et les lipides sont stockés dans les tissus adipeux. Le passage à une alimentation riche en lipides, chez un nouveau-né, nécessite l'activation de la fonction de lipolyse. De plus, au cours des premiers jours après la naissance, le foie produit en grande quantité des corps cétoniques, une source énergétique importante pour le cerveau (Beath, 2003).

Pour conclure, le foie fœtal joue un **rôle très important dans l'hématopoïèse** chez la souris et chez l'homme. Néanmoins, **certaines fonctions métaboliques sont assurées par les hépatocytes déjà bien avant la naissance** : la glycolyse, la glycogenèse, la synthèse des protéines plasmatiques, la β-oxydation des AG et la production de la bile. Avec le passage à une nutrition riche en lipides après la naissance, **les autres fonctions métaboliques entrent en jeu très rapidement afin d'assurer l'homéostasie métabolique**.

3-4) Rôle central du foie pendant la vie adulte

Le foie est un **organe clé du métabolisme glucidique, lipidique et protéique** pendant la période postnatale, assurant le maintien de l'homéostasie énergétique et nutritionnelle. Sa fonction endocrine implique la sécrétion des nombreux métabolites et substances (glucose, lipoprotéines, protéines plasmatiques) dans le sang. La fonction exocrine du foie consiste à sécréter des acides biliaires, indispensables pour digérer les lipides. Le foie joue également un rôle important dans l'élimination des déchets du métabolisme endogène : l'ammoniaque (produit de la dégradation des protéines), la bilirubine (produit de la dégradation de l'hème) ou les xénobiotiques.

3-4-1) Métabolisme glucidique dans le foie

Dans le sang, le niveau du glucose, source fondamentale de l'énergie et précurseur de la synthèse de biomolécules, est finement régulé. Le foie assure une détection du niveau du glucose en circulation, son utilisation (la **glycolyse**), sa production (la **néoglucogenèse**) et son stockage sous forme de glycogène (la **glycogénogenèse**). Seul organe hyperglycémiant et hypoglycémiant à la fois, **le foie libère du glucose à jeun** quand son niveau est bas, et en assure

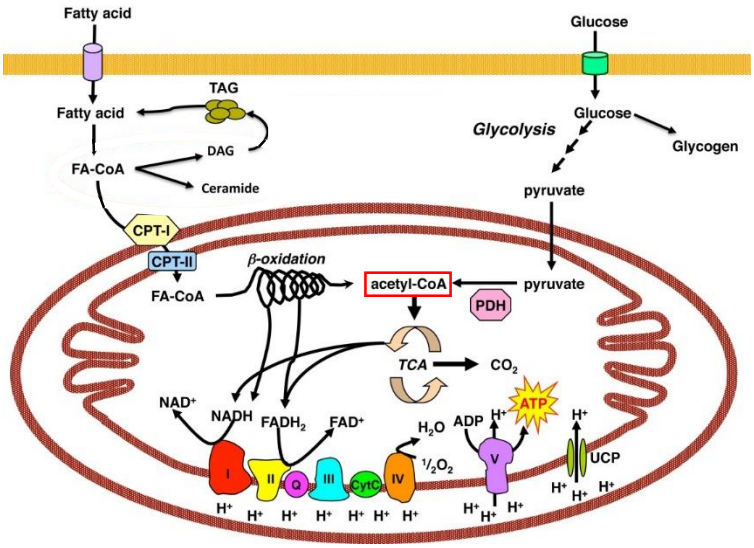


Figure 48. Schéma du métabolisme lipidique et glucidique dans l'hépatocyte

Des acides gras et du glucose peuvent être métabolisé ou stocké dans l'hépatocyte, en forme des tryglycérides (TAG) ou du glycogène respectivement. Dans la mitochondrie, les acides gras et le pyruvate sont oxydés en acétyl-coenzyme A (Acetyl-CoA), qui entre dans le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs, la β-oxydation et la glycolyse produisent NADH et $FADH_2$, donneurs d'électrons pour une chaine de transport d'électrons, qui génère de l'énergie sous forme d'ATP.

FA – acides gras (fatty acids), TCA – cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs), TAG – triacylglycérol (triglycéride), DAG – diacylglycérol, NADH – nicotinamide adénine dinucléotide, FADH – flavine adénine dinucléotide, PDH – pyruvate déshydrogénase, CPT – carnitine O-palmitoyltransférase, UCP – uncoupling protein, ATP – adénosine-5′-triphosphate.

Adapté de Turner, 2013

le stockage en phase postprandiale, quand son niveau plasmatique est élevé (Oosterveer and Schoonjans, 2014).

Après le repas, la glycémie plasmatique diminue grâce au transport actif du glucose, du sang vers l'hépatocyte via le transporteur *Glut2* (Oosterveer and Schoonjans, 2014). Ensuite, dans le cytoplasme de l'hépatocyte, le glucose est phosphorylé par la **glucokinase** (GCK), une hexokinase spécifique du foie, en glucose-6-phospate (G6P) qui entre dans la cascade de la glycolyse anaérobique (Figure 48). Son produit final, le pyruvate, est transformé dans la mitochondrie en **acétyl-coenzyme A** (Acetyl-CoA), le substrat du **cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs)**, voie de convergence des réactions cataboliques. L'oxydation du glucose, via la glycolyse et le cycle de Krebs, permet ainsi de produire de l'ATP. En outre, le cycle de Krebs fournit des acides aminés, pour la synthèse des protéines, et le citrate, pour la synthèse des lipides. Dans la phase postprandiale, la glycogène synthase transforme le G6P en glycogène, ce qui rend possible le stockage du glucose (Oosterveer and Schoonjans, 2014).

Lors du jeûne, la production endogène du glucose dans le foie permet le maintien du niveau du glucose dans le sang. Dans un premier temps, au cours de la glycogénolyse, le G6P est libéré des dépôts de glycogène et ensuite transformé en glucose par la glucose-6-phosphatase (G6Pase). Si le jeûne est prolongé, le glucose est synthétisé *de novo* par le foie pendant la néoglucogenèse à partir des substrats suivants : les acides aminés, le lactate ou le glycérol (Oosterveer and Schoonjans, 2014).

Le foie est capable de subvenir aux besoins énergétiques de l'organisme, grâce à une **régulation fine de la glycémie**, à ses capacités de stockage de glycogène et de la cétogenèse. **Les hépatocytes sont ainsi les seules cellules capables d'utiliser et de produire le glucose**, car ils possèdent tous les enzymes nécessaires.

3-4-2) Métabolisme lipidique hépatique

En cas d'hypoglycémie, le foie utilise des AG, issus de la lipolyse des triglycérides (TG), en tant que substrat énergétique. Les **AG sont métabolisés via la β-oxydation**, par clivages successifs dans la mitochondrie. Le produit final de la β-oxydation, l'acétylCoA, intègre le cycle de Krebs, de façon à ce que le pyruvate soit exclusivement réservé à la néoglucogenèse (Figure 48). Au cours d'un jeûne prolongé, les **corps cétoniques**, produits à partir de l'acétylCoA, subviennent aux **besoins énergétiques des autres tissus**.

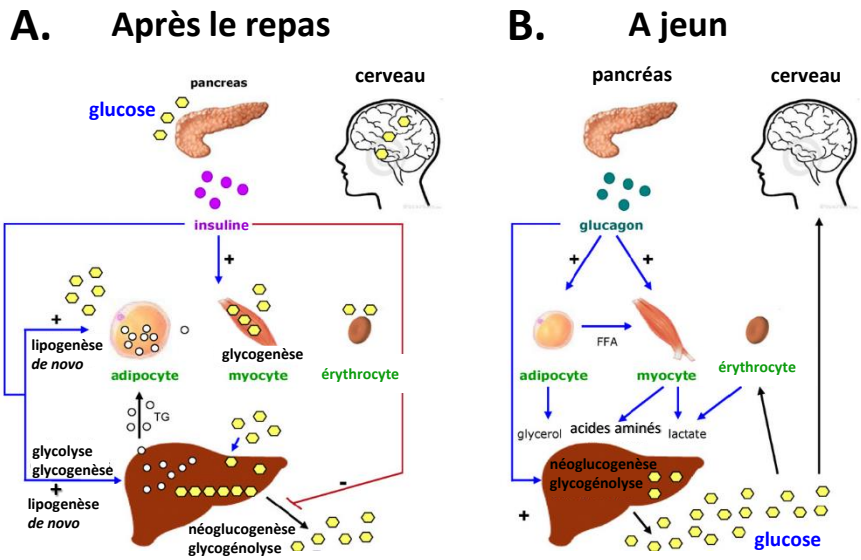


Figure 49. Contrôle hormonal du métabolisme hépatique

(A) Après le repas : sécrétion de l'insuline par le pancréas. L'insuline stimule la glycolyse et la glycogenèse dans le muscle et le foie et inhibe la glycogénolyse et la néoglucogenèse hépatiques. De plus, l'insuline stimule la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux, ainsi qu'une mobilisation des TG dans le foie.

(B) A jeun : le pancréas secrète le glucagon, qui stimule la mobilisation des lipides du tissu adipeux, qui se dirigent vers les muscles et le foie. Le glycérol, les acides aminés et la lactate sont utilisés pour la production du glucose par le foie. Glucagon stimule la glycogénolyse et la néoglucogenèse hépatique. Le glucose d'origine hépatique est utilisé par les érythrocytes et le cerveau.

FFA – acides gras, TG – triglycérides (ronds blancs). Les hexagones jeunes – glucose.

Adapté de Jitrapakdee, 2012

Après le repas, les lipides alimentaires, provenant de l'intestin, sont captés au niveau du foie. Les **lipases hépatiques** dégradent les TG en AG, afin de synthétiser de nouveaux TG. Le foie est l'organe principal de la **lipogenèse *de novo***. Issu du cycle de Krebs, le citrate est transformé en AcetylCoA dans le cytoplasme, ensuite en MalonylCoA, qui est le substrat des AG plus complexes (Ameer et al., 2014). **Les TG synthétisés par l'hépatocyte, sont sécrétés dans le sang dans des lipoprotéines de très basse densité** (VLDL, *very low density lipoprotein*), **afin de les faire parvenir aux tissus périphériques** (Ameer et al., 2014).

Le foie remplit bien d'autres fonctions du métabolisme lipidique : la **synthèse et la dégradation du cholestérol**, ainsi que la **production des acides biliaires** à partir du cholestérol. La bile est sécrétée par la suite dans l'intestin, où elle contribue à la digestion des graisses et l'absorption des vitamines liposolubles.

Le foie est un **organe vital du métabolisme lipidique** : il permet une oxydation des AG afin d'obtenir de l'énergie et de produire des corps cétoniques, ainsi qu'une production des lipoprotéines, des TG, du cholestérol et des acides biliaires.

3-4-3) Contrôle hormonal du métabolisme énergétique

L'insuline joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique. Elle est libérée par les cellules β pancréatiques en réponse à une hyperglycémie et a un effet anabolique sur le métabolisme, c'est-à-dire qu'elle induit le stockage de l'énergie et inhibe sa production. **L'insuline stimule la glycolyse, la glycogénogenèse et la lipogenèse alors qu'elle inhibe la néoglucogenèse et la glycogénolyse dans le foie** (Figure 49) (Gathercole et al., 2013). Au cours du jeûne, les cellules α du pancréas produisent le glucagon, une hormone catabolique, dont les effets sont opposés à ceux de l'insuline. **Le glucagon stimule la production du glucose par glycogénolyse et néoglucogenèse dans le foie**. Les glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme et corticostérone chez les rongeurs), produits par les glandes surrénales en réponse au stress, ont un effet métabolique dans le foie : ils stimulent la néoglucogenèse (Jitrapakdee, 2012).

L'expression des gènes du métabolisme lipidique et glucidique est régulée par de nombreux **facteurs de transcription et récepteurs nucléaires**, induits par les hormones. Par exemple, **chRebp** (carbohydrate response element-binding protein), **Srebp1c** (sterol regulatory element-binding protein-1c) et **Lxr** (liver X receptors) sont des régulateurs de la lipogenèse. La néoglucogenèse, en revanche, est régulée par **Creb** (cAMP-responsive element binding

protein), **Gr** (Glucocorticoid receptor), Pgc1α (peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α) et **C/EBP** (CCAAT enhancer-binding protein) (Gathercole et al., 2013; Jitrapakdee, 2012).

Les voies du métabolisme glucidique, lipidique et protéique sont finement régulées et interagissent entre elles dans le foie, permettant l'intégration du métabolisme et une redistribution des nutriments aux autres organes selon leurs besoins.

3-5) Altération du foie dans le cas d'obésité / diabète

3-5-1) La stéatose et l'hépatite stéatosique non alcooliques

L'obésité et le diabète de type 2 sont souvent associés à un ensemble de maladies du foie, la **stéatose hépatique** (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) et **l'hépatite stéatosique** (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) non alcooliques, qui ne sont pas liés à une consommation excessive d'alcool. **La stéatose hépatique est une accumulation excessive de triglycérides (TG) et d'AG dans les hépatocytes**. La stéatose peut progresser en hépatite stéatosique, qui est caractérisée par un état d'inflammation, la destruction des hépatocytes et éventuellement par une **fibrose**, le remplacement des lésions par du tissu fibreux (Stanton et al., 2011). Dans certains cas, la fibrose peut entrainer une **cirrhose**, un cancer du foie induisant une insuffisance hépatique. Les NAFLD et NASH sont des maladies potentiellement mortelles dont la prévalence est en augmentation (World Gastroenterology Organisation, 2012).

3-5-2) Etiologie de la stéatose hépatique

La stéatose hépatique est une maladie multifactorielle : l'obésité, l'insulinorésistance, la sédentarité sont des facteurs de risque. La **dérégulation chronique du métabolisme lipidique et glucidique** dans le foie est une cause de cette maladie. L'accumulation de TG dans le foie peut être due à différents mécanismes (Li et al., 2015) :

- augmentation de l'absorption par le foie des lipides alimentaires ou des AG libres, relargués dans la circulation sanguine suite à une lipolyse dans le tissu adipeux blanc ;
- augmentation de la lipogenèse *de novo* dans le foie ;
- diminution de la β-oxydation des AG ;
- diminution de la sécrétion des TG produits par le foie.

3-5-3) Mécanismes épigénétiques impliqués dans la stéatose hépatique

Etant impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique, les mécanismes épigénétiques peuvent contribuer à la pathogenèse de la NAFLD. **La méthylation au niveau des gènes du métabolisme** est modifiée dans le foie en cas de stéatose hépatique (Sun et al., 2015). Par exemple, les gènes du métabolisme lipidique, ***Pparα***, ***Lpl***, ***Pgc1α***, et ***Fasn*** (fatty acid syntase), sont hyperméthylés dans le foie des souris sous régime HFD ayant une hépatite stéatosique sévère (Pruis et al., 2014). Chez les patients souffrant de stéatose hépatique, l'hyperméthylation du promoteur de *Pgc1α*, un régulateur majeur du métabolisme hépatique, est associée avec le niveau de l'insuline à jeun. De plus, le niveau de méthylation est inversement corrélé avec le niveau de l'expression de ce gène (Sookoian et al., 2010) (Tableau II, Annexes). Dans le foie des rats obèses, le promoteur de la ***glucokinase***, gène clé de la glycolyse, est hyperméthylé (Jiang et al., 2011). En même temps, une diminution de l'expression de ce gène et de l'activité enzymatique de la GK est observée. Le métabolisme glucidique est ainsi perturbé chez ces rats souffrant de stéatose hépatique.

Les modifications des histones sont également impliquées dans la stéatose hépatique. Chez la souris, la stéatose hépatique, induite par le régime HFD, est associée à une altération du transcriptome hépatique (Jun et al., 2012). Parmi les gènes dérégulés, les lysines déméthylases ***Kdm3b***, ***Kdm5b*** et ***Kdm5c*** sont surexprimés. L'étude, réalisée *in vitro* sur des hépatocytes exposés aux lipides afin d'induire la stéatose, a démontré une altération des marques des histones H3K4me3 et H3K9me3 au niveau des promoteurs de 16 gènes du catabolisme lipidique, y compris *Pparα* (Jun et al., 2012). Ainsi, la méthylation des histones serait impliquée dans la pathogenèse de la NAFLD (Attig et al., 2013).

L'acétylation des histones, résultant de la balance entre l'activité de HAT et de HDAC ou sirtuines, peut jouer un rôle dans la stéatose hépatique. La surexpression chez la souris d'une lysine acétyltransférase ***Kat3b*** (*p300*) augmente le niveau de H3K9ac au niveau du promoteur du gène de la L-pyruvate kinase, enzyme de la dernière étape de la glycolyse, et favorise le développement de la stéatose hépatique, de l'intolérance au glucose et de l'insulinorésistance. L'expression de certains gènes impliqués dans la lipogenèse et la néoglucogenèse est augmentée (Bricambert et al., 2010) (Tableau II, Annexes).

Chez les patients atteints de NAFLD, le niveau protéique de désacétylases **SIRT1** et **SIRT6** est réduit (Tableau II, Annexes) (Kim et al., 2010). De plus, l'inv alidation hépatique de *Sirt6* provoque la stéatose chez la souris. La SIRT6 régule l'expression des gènes de la

glycolyse et de la β-oxydation des AG du métabolisme lipidique via la désacétylation de H3K9, protégeant ainsi le foie contre la NAFLD. Ces résultats montrent l'implication de ces deux sirtuines dans la régulation du métabolisme hépatique, ainsi que leur lien avec la stéatose, chez l'animal et chez l'homme.

Les preuves de plus en plus nombreuses, obtenues à partir de modèles animaux ou chez l'homme, montrent des altérations de marques épigénétiques dans le foie présentant une stéatose. Cela suggère **l'implication des mécanismes épigénétiques dans l'étiologie de la NAFLD** (Sun et al., 2015).

3-6) Lien entre rythmes circadiens et métabolisme

3-6-1) Dialogue entre l'horloge circadienne et le métabolisme énergétique

Le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus synchronise les cycles du sommeil / de l'activité avec les rythmes alimentaires. Cette **horloge centrale coordonne l'activité métabolique**, en régulant des cycles du stockage et de l'utilisation de l'énergie dans les organes périphériques. Les perturbations des rythmes circadiens ou des mutations dans les gènes de la machinerie circadienne peuvent déréguler le métabolisme dans le foie et contribuer ainsi au développement du syndrome métabolique (Feng and Lazar, 2012).

L'horloge circadienne, via les mécanismes épigénétiques, régule l'expression de gènes clés de la fonction physiologique ciblée, de manière tissu-spécifique. **Des gènes du métabolisme lipidique, glucidique, et protéique montrent une expression cyclique dans le foie murin** (Akhtar et al., 2002; Panda et al., 2002). Des gènes de la glycolyse atteignent leur pic d'expression au cours d'une phase de la consommation alimentaire, permettant le catabolisme actif du glucose. En revanche, le pic de *Pepck* a lieu à la fin de la période d'activité, afin de permettre une activation de la production du glucose pendant le sommeil (Akhtar et al., 2002). L'expression de facteurs de transcription peut être sous contrôle circadien (Feng and Lazar, 2012). La lysine acétyltransférase **Clock**, acteur majeur de la machinerie circadienne, régule l'expression de *Pparα*, de manière cyclique (Oishi et al., 2005) (Tableau II, Annexes). Chez les souris invalidées pour le gène *Clock* dans le foie, la cyclicité d'expression de *Pparα* est perdue. Ces résultats suggèrent que Clock contribuerait à l'expression rythmique de gènes cibles de *Pparα*, impliqués dans le métabolisme lipidique.

Le statut métabolique des hépatocytes peut lui-même altérer les rythmes circadiens dans le foie (Feng and Lazar, 2012). Les nutriments, la prise alimentaire ou le jeûne changent l'état d'oxydo-réduction du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+/NADH) mitochondrial (Feng and Lazar, 2012). La désacétylase Sirt1, dépendante de NAD^+, est un régulateur de l'activité de Clock et de ces partenaires. L'invalidation de *Sirt1* dans le foie diminue l'expression des gènes de la β-oxydation des AG et celle de la voie de signalisation de *Pparα* et, par conséquence, provoque une stéatose hépatique (Purushotham et al., 2009) (Tableau II, Annexes).

Le régime hyperlipidique chez la souris altère l'expression et la cyclicité des gènes circadiens dans le foie, ainsi que celle des gènes métaboliques (*Pparα*, *Pparγ*, *Fas*…). Cela est associé à une augmentation de la prise alimentaire pendant la période du repos (Kohsaka et al., 2007).

3-6-2) Dialogue entre les rythmes circadiens, l'acétylation des histones et le métabolisme

La machinerie de l'acétylation des histones est impliquée dans la régulation circadienne de l'expression génique. Par exemple, l'histone désacétylase ***Hdac3*** est recrutée par le récepteur nucléaire circadien ***Rev-erbα*** dans le foie. Le niveau de H3K9ac, sa marque cible, fluctue au cours de la journée, de façon inversement proportionnelle au recrutement de HDAC3 (Feng et al., 2011). De plus, l'invalidation des souris pour *Rev-erbα*, ainsi que *Hdac3* dans le foie, provoque une stéatose hépatique (Tableau II, Annexes). En effet, leurs gènes cibles sont impliqués dans le métabolisme lipidique. Ces résultats suggèrent que l'acétylation des histones est impliquée dans la stéatose hépatique.

3-6-3) Rythmes circadiens dans le foie fœtal chez la souris

Une étude détaillée a démontré que certains gènes de la machinerie circadienne sont exprimés dans le foie *in utero* : l'expression de *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* et *Per2* augmente progressivement à partir d'E14. Cependant, l'expression de *Bmal1* et *Per2* ne présente pas encore de cyclicité circadienne au terme de la gestation (Dolatshad et al., 2010). De plus, des gènes circadiens (*Bmal1*, *Clock*, *Cry1-3*, *Per2*, *Reverbα* et *β*) sont 2 fois moins exprimés dans le foie fœtal à terme par rapport au foie adulte (Li et al., 2012). Les rythmes circadiens sont entrainés par l'horloge maternelle au cours du développement *in utero* (Serón-Ferré et al.,

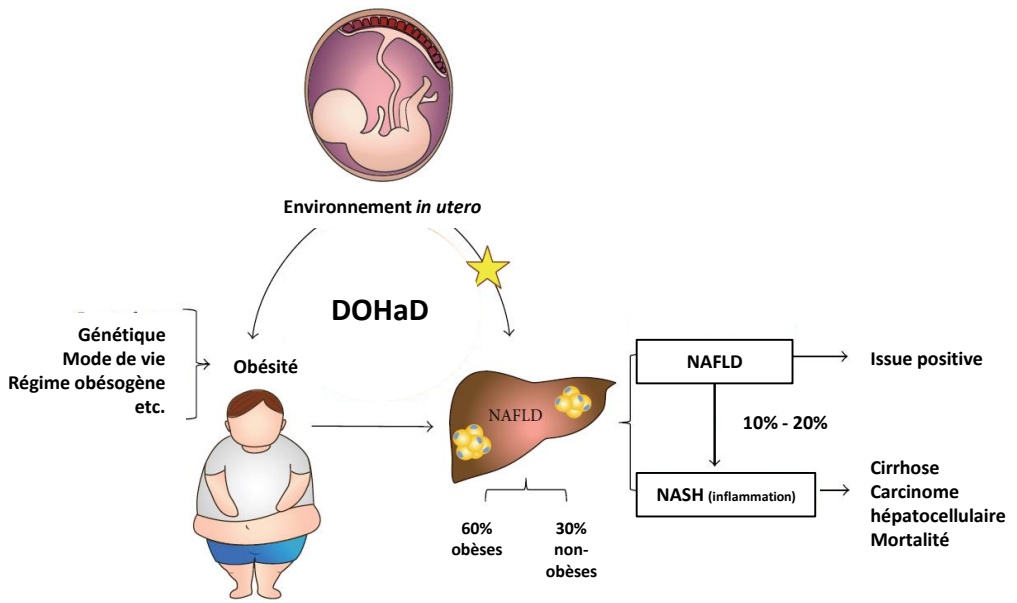


Figure 50. Conditionnement développemental de la susceptibilité à la stéatose hépatique

La stéatose hépatique peut être provoquée par l'obésité. L'environnement *in utero* peut conditionner la prédisposition à la stéatose hépatique. La stéatose hépatique est une accumulation excessive des lipides dans le foie. La stéatose peut progresser dans une forme plus sévère, la stéatohépatite, associée avec l'inflammation. La stéatohépatite est associée à une cirrhose, un carcinome hépatocellulaire et une risque plus élevée de mortalité.

DOHaD – concept des origines développementales de la santé (Developmental Origins of Health and Disease), NAFLD – stéatose hépatique non-alcoolique (non-alcoholic fatty liver disease), NASH – stéatohépatite non-alcoolique (non-alcoholic steatohepatitis).

Adapté de Li et al., 2015

2012). **La santé de la mère et ses maladies chroniques pourraient éventuellement influencer la mise en place de la rythmicité de l'horloge périphérique chez le fœtus.**

3-7) Programmation développementale dans le foie par la physiologie de la mère

3-7-1) Effets de la nutrition maternelle sur le phénotype hépatique des descendants adultes

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, l'exposition à un environnement nutritionnel maternel délétère prédispose aux maladies à l'âge adulte. D'après plusieurs études sur les modèles animaux, **des altérations de la fonction hépatique *in utero* peuvent avoir des conséquences néfastes sur le métabolisme et conduire ainsi à des maladies hépatiques**, telles que la NAFLD ou NASH (Figure 50). Les preuves du concept de la DOHaD, obtenues sur les modèles animaux, sont représentées dans le Tableau V (Annexes). Ce tableau récapitule les effets de la nutrition maternelle (surnutrition, régime HFD ou régime pauvre en protéines) sur le phénotype du foie fœtal ou adulte chez les descendants. Concernant les mécanismes moléculaires de ces effets, des connaissances actuelles sur des altérations des voies métaboliques ou des modifications épigénétiques sont récapitulés dans ce tableau.

Chez la souris, la stéatose hépatique est observée assez tôt dans la vie postnatale dans le cas d'exposition au régime HFD *in utero* (Ashino et al., 2012; Bruce et al., 2009; Elahi et al., 2009; Gregorio et al., 2010; Oben et al., 2010). De plus, **l'obésité maternelle prédispose les descendants à développer une hépatite stéatosique**, une forme plus sévère de la NAFLD, lorsqu'ils sont confrontés à un environnement nutritionnel obésogène. Ainsi, un individu exposé à un 2ème facteur de risque plus tard dans la vie peut développer une forme plus grave de cette maladie (Bruce et al., 2009; Gregorio et al., 2010).

Les effets sur le phénotype hépatique peuvent varier selon la période d'exposition au HFD (pendant la gestation ou la lactation, ou pendant ces deux périodes), ce qui prouve l'existence de **fenêtres critiques de sensibilité à un environnement maternel néfaste** (Gregorio et al., 2010; Oben et al., 2010). Par exemple, dans le foie des descendants adultes dont les mères ont été sous régime HFD uniquement pendant la lactation, le niveau des TG est augmenté. Au contraire, dans le cas d'une exposition à HFD pendant la gestation, leur niveau n'est pas modifié (Gregorio et al., 2010) (Tableau V, Annexes). De la même façon, le niveau

du transporteur hépatique de glucose, Glut2, est réduit uniquement dans le cas d'une exposition au HFD *in utero*.

3-7-2) Mécanismes de la programmation développementale du métabolisme hépatique

Effets du métabolisme maternel sur le transcriptome hépatique et l'activité mitochondriale. Une altération de la transcription génique dans le foie constitue un mécanisme de base de la programmation développementale (Sookoian et al., 2013). Le régime HFD maternel affecte le transcriptome hépatique des descendants, mais différemment selon le sexe : seulement 10% des gènes sont dérégulés de la même façon (Mischke et al., 2013) (Tableau V, Annexes). Les gènes dérégulés ne sont pas les mêmes : chez les mâles, ils sont impliqués dans des fonctions telles que la prolifération cellulaire et le développement des tissus, tandis que chez les femelles, ce sont des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et énergétique qui sont affectés. **Les effets programmateurs maternels sur le phénotype hépatique sont ainsi spécifiques du sexe chez la souris.**

De nombreuses études ont mis en lumière une modification **de l'expression des facteurs de transcription** ou des gènes clés des voies métaboliques par la nutrition maternelle (Tableau V, Annexes). Les gènes clés de la **voie de la néoglucogenèse** sont des cibles connues de la programmation développementale. Chez les rongeurs, l'expression de *Pepck* et de *G6Pase* (glucose-6-phosphatase) est augmentée dans le foie des descendants adultes de mères obèses, conduisant à la surproduction du glucose chez le fœtus (Ashino et al., 2012; Strakovsky et al., 2011). A contrario, les données chez le mouton montrent un effet opposé sur l'activité transcriptionnelle de *Pepck* : diminution de son expression dans le foie, fœtal ou adulte, des descendants de brebis obèses (Nicholas et al., 2013a; Rattanatray et al., 2014). Ces résultats controversés sont probablement dus aux différents modèles expérimentaux (espèce, lignée génétique, régime…) utilisés dans ces études.

La **voie de signalisation de l'insuline** hépatique peut être altérée chez les descendants adultes des mères obèses : le niveau des protéines impliquées dans cette voie ou de leur phosphorylation est diminué chez la souris (Ashino et al., 2012; Oben et al., 2010) (Tableau V, Annexes). Chez le mouton, l'obésité maternelle provoque une augmentation de l'expression de 3 miRNA impliqués dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline dans le foie des descendants de 4 mois (Nicholas et al., 2013a). Le niveau des protéines de la cascade, induite

par l'insuline, est diminué, ce qui contribue au développement de l'insulinorésistance au niveau hépatique.

Des altérations du **métabolisme lipidique** au cours du développement précoce jouent un rôle important dans la programmation de la NAFLD à long terme. L'expression des gènes de la lipogenèse, plus précisément de la synthèse des AG et des TG, est augmenté dans le foie des descendants des mères obèses (Bruce et al., 2009; Pruis et al., 2014). Les facteurs de transcription *Srebp* (sterol regulatory element-binding proteins) sont augmentés par l'obésité maternelle dans plusieurs études, permettant de programmer l'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* (Bruce et al., 2009; Gregorio et al., 2010; Pruis et al., 2014; Strakovsky et al., 2011). De la même façon, d'autres facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme énergétique (*Cebpα*, *Cebpβ*, *Pgc1α* et *Reverbα*) sont dérégulés par le régime maternel (Tableau V, Annexes).

L'expression des gènes du **stress oxydatif** et de **l'inflammation** peut également être augmentée par l'obésité maternelle, contribuant ainsi à l'évolution de la NAFLD vers la NASH chez les descendants à l'âge adulte (Bruce et al., 2009; Gregorio et al., 2010).

Une altération de **l'activité mitochondriale** pendant le développement *in utero* aboutirait à une diminution de la capacité du foie à métaboliser des lipides (Sookoian et al., 2013). En effet, l'activité de la chaine mitochondriale de transport d'électrons est réduite chez les descendants des mères sous HFD (Bruce et al., 2009). Cela conduit à une diminution de la β-oxydation des AG, et à une augmentation de la synthèse des TG à partir d'Acétyl-CoA (Tableau V, Annexes).

Mécanismes épigénétiques affectés dans le foie par le métabolisme maternel. Certaines marques épigénétiques sont altérées dans le foie des descendants des mères obèses à l'âge adulte (Tableau V, Annexes). La méthylation de l'ADN est un des mécanismes de conditionnement de l'expression génique à long terme. L'augmentation de la méthylation des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (*Pparα*, *Lpl*, *LxRα*, *Pgc1a*, *Fasn*), ainsi que dans le contrôle de lipogenèse par l'insuline (*Insig2*, insulin induced gene 2) est observée chez les descendants des souris sous le régime Western diet (Pruis et al., 2014). Toutefois, deux autres études n'ont pas permis d'observer d'effet significatif du régime maternel, ni sur la méthylation d'ADN au niveau global, ni au niveau du promoteur d'un gène candidat, *Pepck* (Cannon et al., 2014; Rattanatray et al., 2014).

Une analyse pangénomique montre une modulation de la méthylation de l'ADN dans 2218 promoteurs et 1438 îlots CpG dans le foie des descendants des mères qui ont pratiqué un exercice physique avant la conception (Wei et al., 2015) (Tableau V, Annexes). Par ailleurs, le niveau de l'expression de 5 gènes du métabolisme lipidique est diminué et anti-corrélé avec le niveau de méthylation dans leurs promoteurs. **La méthylation de l'ADN contribuerait à la réponse adaptative au niveau de l'expression génique hépatique des descendants**, menant ainsi à une diminution du cholestérol et des TG hépatiques chez les descendants.

La malnutrition maternelle conditionnerait l'expression des gènes clé du métabolisme des glucocorticoïdes chez la descendance. La déficience en calcium *in utero* chez le rat provoque une hypométhylation au niveau des CpG spécifiques de *GR* et de la *11βHsd1* dans le foie (Takaya et al., 2013). L'expression du *GR* est diminuée chez ces animaux, contrairement à la *11βHsd1*. Par ailleurs, le niveau de corticostérone dans le sérum est plus élevé chez les mâles dont les mères ont souffert de carences en calcium.

Chez le rat, le régime pauvre en protéines au cours de la gestation induit une hypométhylation des promoteurs du *GR* et de *Pparα* chez les descendants adultes (Lillycrop et al., 2005; Lillycrop et al., 2007) (Tableau V, Annexes). Une diminution de l'expression et du recrutement de *Dnmt1* vers le promoteur de *Gr* pourrait expliquer cette hypométhylation. En outre, le promoteur de *Gr* est enrichi en marques de **l'acétylation** et de la **méthylation des histones** activatrices, H3K9ac, H4K9ac, H3K9me, et dépourvu d'une marque répressive, H3K9me2. En conséquence de ces événements épigénétiques, le *Gr* est plus fortement exprimé dans le foie des descendants adultes des mères sous-nourries, tout comme son gène cible, *Pepck* (Lillycrop et al., 2007).

Dans une autre étude sur le rat, l'expression de *Pparα* est réduite chez les descendants des mères obèses. Cette répression transcriptionnelle est en accord avec un enrichissement du promoteur de ce gène par une marque répressive H3K27me3. En même temps, l'expression de la lysine méthyltransférase *Kmt6* (Ezh2, enhancer of zeste homolog), le membre du complexe Polycomb apposant cette marque, est augmentée. **La méthylation des histones est donc impliquée dans la conditionnement du métabolisme lipidique hépatique** via la régulation de l'expression de *Pparα* (Tableau V, Annexes) (Borengasser et al., 2014a).

Conditionnement de l'horloge circadienne dans le foie par le métabolisme maternel. Chez le rat, l'obésité maternelle, induite par un régime hyperlipidique, altère l'expression des gènes de l'horloge circadienne *Clock*, *Bmal1* (*Arntl*), *Cry2*, *Per1* et *Per2* dans

le foie des descendants des mères obèses qui sont eux-mêmes sous régime HFD (Borengasser et al., 2014a). L'amplitude du cycle est diminuée pour ces gènes, tandis que la rythmicité est maintenue (Tableau V, Annexes). Ces résultats montrent qu'une combinaison de **l'obésité maternelle** et de l'environnement obésogène, après le sevrage, **conditionne les oscillations de l'expression des gènes de la machinerie circadienne dans le foie**.

Une étude chez la souris montre qu'une **restriction protéique *in utero*** provoque la dérégulation de l'horloge dans le foie, bien avant le développement d'une obésité plus sévère à l'âge adulte. L'expression hépatique des gènes de la lipogenèse, de la synthèse des TG et de la néoglucogenèse est altérée chez les descendants âgés de 8 semaines, sous régime contrôle (Sutton et al., 2010) (Tableau V, Annexes).

Chez les primates, il a été démontré que l'expression de certains gènes circadiens dans le foie encore *in utero* peut être impactée par le **régime hyperlipidique maternel** (Suter et al., 2012) (Tableau V, Annexes). Une intervention nutritionnelle chez les mères avant la conception, consistant en un changement du régime HFD pour un régime CD, a permis de normaliser l'expression des gènes étudiés. De plus, le promoteur de *Npas2* (*neuronal PAS domain protein 2*), le paralogue de *Clock*, a été enrichi en acétylation de l'H3K14, marque activatrice, chez les fœtus des mères sous régime HFD. Cependant, dans le foie des descendants adultes, l'expression de *Npas2* n'était pas altérée à l'âge étudié. **Une dérégulation de l'horloge circadienne hépatique peut ainsi avoir lieu dès le développement *in utero*, suite à une exposition à l'obésité maternelle.** Les mécanismes épigénétiques potentiels, leur impact à long terme sur les rythmes circadiens et sur l'homéostasie énergétique de l'organisme (susceptibilité à l'obésité ?) restent encore à élucider.

L'ensemble de ces résultats atteste que les marques épigénétiques, la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones, sont altérées dans le foie adulte par un environnement *in utero* délétère. Des perturbations de la régulation épigénétique des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique dans le foie pourraient ainsi contribuer au développement d'une pathologie à l'âge adulte.

3-7-3) Perturbations hépatiques *in utero* par une nutrition hyperlipidique maternelle

La plupart des travaux se concentrent sur les effets du régime HFD maternel sur le phénotype du foie des descendants adultes ; et très peu d'études s'intéressent aux évènements dans le foie fœtal. Pourtant, la susceptibilité aux maladies hépatiques peut trouver son origine lors du développement précoce.

Altérations structurelles et fonctionnelles du foie au stade fœtal. Chez le macaque japonais, un modèle proche de l'humain, l'excès de lipides dans la nutrition maternelle, indépendamment de l'obésité ou de l'insulinorésistance, affecte le foie du fœtus (McCurdy et al., 2009). **Une accumulation des TG** et une activation du stress oxydatif sont observées dans le foie fœtal. Puis, la stéatose hépatique persiste en période post-natale chez les descendants des mères sous régime HFD (Tableau V, Annexes). L'expression des gènes du métabolisme glucidique est augmentée chez les fœtus HFD, ainsi que le niveau protéique des facteurs de transcription *Pgc1a* et *Hnf4a* (hepatocyte nuclear factor 4α). De manière intéressante, la *Pepck* s'exprime prématurément dans le cas d'une exposition au HFD *in utero*, alors que l'expression de cette enzyme est normalement faible avant la naissance. **L'intervention nutritionnelle chez les mères** (le remplacement du régime HFD par un régime CD) **permet de diminuer l'accumulation des TG** de 37%, ainsi que le niveau d'expression génique dans le foie fœtal, sans néanmoins restaurer ces paramètres au niveau des animaux contrôles (McCurdy et al., 2009).

Dans une autre étude, le régime HFD a été appliqué pendant les différentes périodes, plus particulièrement en période préconceptionnelle et pendant la gestation. Le régime HFD maternel, indépendamment de la période d'exposition, provoque une réduction de la croissance fœtale chez la souris (Plata et al., 2014) (Tableau V, Annexes). L'exposition au régime uniquement après E9.5 est suffisante pour modifier l'**expression des gènes liés à la croissance fœtale, métabolisme glucidique et le stress oxydatif**. De manière intéressante, le niveau d'expression de *Sirt1* est augmenté dans le foie des fœtus sous le régime HFD. Le retour au régime CD après la mi-gestation permet de rétablir le niveau de *Sirt1*. L'impact éventuel sur le niveau d'acétylation des histones reste à déterminer.

Altérations des marques épigénétiques dans le foie fœtal. Chez le macaque, le régime HFD chronique de la mère impacte l'acétylation de l'histone H3 : le niveau global d'une marque activatrice, H3K14ac, est augmenté dans le foie au terme de la gestation (Tableau V,

Annexes) (Aagaard-Tillery et al., 2008). Concernant les acteurs de l'acétylation, l'expression du transcrit et l'activité enzymatique de l'histone déacétylase Hdac1 sont fortement diminuées chez les fœtus HFD. Par ailleurs, cet effet répressif sur l'expression de *Hdac1* est conservé à l'âge de 1 mois. La même équipe a confirmé ces résultats chez la souris : le niveau hépatique de H3K14ac et H3K9me3 est plus elevé sous régime HFD à E18.5 et à l'âge de 5 semaines (Suter et al., 2014). Les sites d'initiation de transcription de 454 gènes sont enrichis avec ces marques, principalement ceux des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique.

Chez le rat, le régime HFD conduit à une altération des marques des histones au niveau du gène de *Pepck* dans le foie à terme. Tout d'abord, ce gène est enrichi par des marques activatrices, l'acétylation de l'histone H4 et la méthylation de H3K4me2, dans sa région codante et en amont du promoteur. Ensuite, son promoteur est dépourvu des marques répressives, H3K9me3 et H3K27me3. Ces modifications peuvent expliquer l'expression élevée de *Pepck*, et ainsi l'hyperglycémie fœtale à terme (Strakovsky et al., 2011).

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats témoigne d'un **effet néfaste de la nutrition riche en lipides chez la mère sur la fonction hépatique du fœtus**. Ce sont les premières données qui montrent des **altérations du niveau de l'acétylation et de la méthylation des histones dans le foie fœtal**, en lien avec la santé de la mère. Ces marques épigénétiques pourraient éventuellement avoir un impact sur le développement et la fonction du foie avec, de surcroit, des répercussions sur le métabolisme à long terme.

RESULTATS

Objectifs de la thèse

Le premier objectif de ce travail est d'étudier les mécanismes épigénétiques sous-jacents aux effets de l'obésité chez la mère sur le phénotype de la descendance à court et à long terme. Le second objectif est d'évaluer si la perte de poids préconceptionnelle entraine un bénéfice quant à ces effets de l'obésité maternelle ou si une mémoire de l'histoire pondérale maternelle est conservée dans la descendance. Pour cela, nous avons mis en place un modèle murin d'obésité maternelle chronique et de perte de poids, en utilisant une approche nutritionnelle. J'ai porté un intérêt particulier aux mécanismes moléculaires dans le placenta et le foie fœtal. Les autres originalités de notre travail ont été de placer la descendance sous régime obésogène, afin de révéler un effet de conditionnement, et d'étudier les femelles et les mâles, afin de déceler un éventuel dimorphisme sexuel dans la réponse à l'environnement maternel. Grâce à ce modèle, nous avons atteint les objectifs suivants :

- ✓ analyse des effets de l'obésité et de la perte de poids maternelle préconceptionnelle sur la croissance fœto-placentaire au terme de la gestation (jour embryonnaire 18.5) ;
- ✓ évaluation de l'expression des gènes de la machinerie épigénétique et des gènes impliqués dans le développement et le métabolisme dans le foie fœtal et dans le labyrinthe et la zone jonctionnelle placentaires ;
- ✓ étude du phénotype de la descendance de la naissance jusqu'à l'âge adulte ;
- ✓ évaluation de la susceptibilité éventuelle des descendants adultes à un environnement obésogène.

Les résultats de cette thèse ont été valorisés par la rédaction de deux publications et de plusieurs revues de synthèses en anglais et en français (Articles 3 à 8, en fin de manuscrit), par de nombreuses présentations à des congrès, en France et à l'étranger (voir Annexes VI). Les travaux rapportés dans cette thèse sont organisés en 2 parties :

- ✓ Article 1 (soumis) : analyse des effets de l'obésité et de la perte de poids maternelle préconceptionnelle sur la croissance fœto-placentaire et sur l'expression génique ;
- ✓ Article 2 (en préparation pour soumission) : analyse des effets de l'obésité et de la perte de poids maternelle sur le phénotype de la descendance adulte.

ARTICLE 1

Expression of epigenetic machinery genes is sensitive to maternal obesity and weight loss in relation to fetal growth

Article soumis pour publication

Introduction

En 2013, la prévalence de l'obésité chez la femme était de 38% (Ng, 2014). L'obésité est un facteur de risque de complications métaboliques et obstétricales au cours de la grossesse (Lee and Koren, 2010). Chez l'homme, **l'obésité maternelle** est associée à un poids fœtal élevé pour l'âge gestationnel ou, au contraire, à **une restriction de la croissance fœtale** (Acosta et al., 2015; Gaudet et al., 2014; Rajasingam et al., 2009). Il a été proposé qu'un apport réduit de nutriments ou d'oxygène, dû à des perturbations de vascularisation et de transport placentaires, pourrait être à l'origine d'une restriction de croissance (Brett et al., 2014; Frias et al., 2011; Hayes et al., 2012; Zhang et al., 2015). L'obésité peut avoir aussi un impact sur l'organogenèse du fœtus, avec des conséquences sur la fonction des organes après la naissance (Williams et al., 2014). La morphologie et la fonction du foie, organe qui contrôle l'homéostasie métabolique, sont altérées *in utero* par l'obésité et/ou la nutrition hyperlipidique de la mère (McCurdy et al., 2009; Plata et al., 2014).

Les mécanismes moléculaires de la restriction de croissance fœtale dans le contexte de l'obésité maternelle ne sont pas connus. Des altérations de la méthylation de l'ADN ou des modifications des histones ont été associées à une restriction de croissance, induite par divers facteurs (Delahaye et al., 2014; Fu, 2004; Park et al., 2008; Raychaudhuri et al., 2008). L'environnement maternel peut altérer les marques épigénétiques dans les tissus fœtaux ou dans le placenta, influençant ainsi le transcriptome et, par conséquent, le phénotype de la descendance (Gabory et al., 2011; Lane et al., 2014). L'épigénome est régulé par la machinerie enzymatique qui appose, enlève ou reconnait les marques épigénétiques. **Le rôle de la machinerie épigénétique dans la restriction de croissance, induite par l'obésité maternelle, reste à définir.**

Compte tenu des nombreux risques pour la mère et l'enfant, il est recommandé aux femmes en surcharge pondérale de perdre du poids avant la conception (Paden and Avery, 2012). Cependant, **les conséquences d'une perte de poids** importante, induite par une intervention nutritionnelle chez les sujets obèses, **sur la croissance du fœtus restent peu connues** (Forsum et al., 2013). Les variations des apports nutritionnels et de la composition corporelle de la mère pendant les périodes clés de la gamétogénèse et du développement peuvent altérer les processus épigénétiques. **Les effets de la perte de poids sur l'expression des gènes de la machinerie épigénétique sont à évaluer.**

Objectifs. Nous avons posé l'hypothèse que **l'obésité maternelle pourrait avoir des effets négatifs sur la croissance fœto-placentaire**. Le but de ce travail était d'étudier les effets de l'obésité maternelle sur **l'expression des gènes impliqués dans la régulation épigénétique et dans le métabolisme et le développement** dans le foie fœtal, le labyrinthe et la zone jonctionnelle placentaires. Nous avons également voulu savoir **si la perte de poids préconceptionnelle, induite par une intervention nutritionnelle, pouvait corriger ces effets sur le phénotype de la descendance**. Cette étude pose la question de la sensibilité de la machinerie épigénétique à l'environnement métabolique maternel.

Sélection des gènes pour une étude transcriptionnelle. Nous avons émis l'hypothèse que l'histoire pondérale de la mère aurait un impact sur l'expression génique dans les tissus placentaires ou fœtaux. Nous avons étudié l'expression de 92 gènes grâce aux cartes micro-fluidiques (*TaqMan Low-density Array*), une technologie de PCRq à haut débit.

Le choix des 60 gènes de la machinerie épigénétique, présents sur ces cartes, est basé sur les données du laboratoire dans nos modèles murins précédents (Attig et al., 2013; Gabory et al., 2012) et sur une analyse bibliographique. Les critères de choix des gènes sont : leur implication dans les processus métaboliques, la croissance fœtale, l'obésité, le diabète de type 2 ou sur leur réponse à la nutrition maternelle (Annexes, Table II). Dans cette étude originale, les gènes des différentes familles des régulateurs épigénétiques, en relation avec la méthylation de l'ADN, et l'acétylation et la méthylation des histones, ont étaient pris en compte.

Ensuite, 32 gènes impliqués dans le développement hépatique ou placentaire, dans le métabolisme énérgétique ou connus comme étant impliqués dans le conditionnement développemental ont été choisis (Annexes, Table III). La liste complète des gènes pris en compte dans cette analyse et les critères de leur sélection sont disponible dans l'Article 1 (Additional file 2 et 3).

Résultats et conclusions

Nous avons démontré dans notre modèle animal que **l'obésité maternelle chronique provoquait une restriction de croissance fœtale** et une insuffisance placentaire au terme de la gestation. La proportion des fœtus à faible poids (SGA, *small for gestational age*) atteint 28% chez les mères obèses. Ce modèle permet d'étudier les mécanismes moléculaires des origines et/ou des conséquences de la restriction de croissance induite par l'obésité maternelle. **L'expression des gènes de la machinerie épigénétique est fortement altérée** dans le foie

fœtal et dans le labyrinthe placentaire. De manière intéressante, nous n'avons pas observé de changements au niveau de la transcription génique dans la zone jonctionnelle, autre couche placentaire.

Pour déterminer si les effets négatifs de l'obésité sur la descendance étaient réversibles, nous avons effectué **une intervention nutritionnelle en période préconceptionnelle**. Le changement du régime hyperlipidique par un régime contrôle, deux mois avant la conception, permet une perte de poids et une normalisation des paramètres métaboliques des femelles au moment de la conception. **Le poids fœtal est partiellement restauré** dans ce groupe, tandis que la proportion des fœtus SGA est complètement normalisée. L'expression d'une partie des gènes, affectés par l'obésité maternelle, est restaurée dans le foie et le labyrinthe placentaire des descendants. Toutefois, **l'expression de certains gènes reste affectée** et ne revient pas au niveau de celle observée dans le foie et le labyrinthe placentaire des fœtus de souris contrôles. Ces données montrent, pour la première fois, **les effets bénéfiques de la perte de poids**, après une obésité chez la mère, sur la croissance fœtale et sur l'expression génique. Les fœtus et les placentas issus des mères qui ont perdu du poids en période préconceptionnelle, présentent une "**adaptation**" au niveau transcriptionnel. Ces résultats témoignent d'une "**mémorisation**" de l'histoire d'obésité des mères dans le phénotype de la descendance.

Cet article révèle principalement que **les gènes impliqués dans l'acétylation des histones sont particulièrement sensibles à l'environnement métabolique et nutritionnel de la mère**. Parmi les gènes dérégulés par l'obésité ou la perte de poids maternelle, les gènes codant des "*writers*" et "*erasers*" de l'acétylation représentent une part importante. D'une part, l'expression des lysines acétyltransférases, qui apposent le groupement acétyle sur les lysines, est augmentée dans le groupe des mères obèses. D'autre part, la plupart des histones désacétylases, qui catalysent la réaction inverse, sont réprimées. L'ensemble de ces altérations pourrait conduire à un niveau d'acétylation plus élevé dans le foie fœtal et le placenta.

La question du lien entre machinerie épigénétique, altérations de l'épigénome, fonctions du foie fœtal et du placenta et conséquences à long terme reste posée. Dans le contexte de l'obésité maternelle, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension du rôle de l'acétylation des histones et des régulateurs de ces marques épigénétiques dans la croissance fœtale.

Expression of epigenetic machinery genes is sensitive to maternal obesity and weight loss in relation to fetal growth

Polina E. Panchenko[1,2], Sarah Voisin[1,2], Mélanie Jouin[1], Luc Jouneau[1], Audrey Prezelin[1], Simon Lecoutre[3], Christophe Breton[3], Hélène Jammes[1], Claudine Junien[1,4] and Anne Gabory[1]

[1] INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy-en-Josas, France

[2]Ecole Doctorale 394 "Physiologie, physiopathologie et thérapeutique", Université Pierre et Marie Curie, 75252 Paris, France

[3] Université Lille, EA4489, Équipe Malnutrition Maternelle et Programmation des Maladies Métaboliques, F59000 Lille, France.
[4]UVSQ, Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Guyancourt, France

Short title: *Epigenetic machinery response to maternal weight trajectories*

Corresponding author: Anne Gabory

Email addresses:

Panchenko PE – ppanchenko@jouy.inra.fr

Voisin S – savoisin@jouy.inra.fr

Jouin M – melanie.jouin@jouy.inra.fr

Jouneau L – luc.jouneau@jouy.inra.fr

Prezelin A – audrey.prezelin@jouy.inra.fr

Lecoutre S – simon.lecoutre@ed.univ-lille1.fr

Breton C – christophe.breton@univ-lille1.fr

Jammes H – helene.jammes@jouy.inra.fr

Junien C – claudine.junien@jouy.inra.fr

Gabory A – anne.gabory@jouy.inra.fr

ABSTRACT

Background. Maternal obesity impacts fetal growth and pregnancy outcomes. To counteract the deleterious effects of obesity on fertility and pregnancy issue, preconceptional weight loss is recommended to obese women. Whether this weight loss is beneficial/detrimental for offspring remains poorly explored. Epigenetic mechanisms could be affected by maternal weight changes, perturbing expression of key developmental genes in placenta or fetus. Our aim was to investigate the effects of chronic maternal obesity on feto-placental growth along with the underlying epigenetic mechanisms. We also tested whether preconceptional weight loss could alleviate these effects.

Results. Female mice were fed either a control diet (CTRL group), a high-fat diet (OB group) or a high-fat diet switched to a control diet two months before conception (WL group). At mating, OB females presented an obese phenotype while WL females normalized metabolic parameters. At E18.5, fetuses from OB females presented fetal growth restriction (FGR; -13%) and 28% of fetuses were small for gestational age (SGA). Fetuses from WL females displayed complete restoration of SGA proportion, but still remained 5% lighter than fetuses from CTRL females. The expression of 60 epigenetic machinery genes and 32 metabolic genes was measured in fetal liver, placental labyrinth and junctional zone. We revealed 23 genes altered by maternal weight trajectories in at least one of three tissues. Fetal liver and placental labyrinth were more responsive to maternal obesity than junctional zone. One third (18/60) of the epigenetic machinery genes were differentially expressed between at least two maternal groups. Interestingly, genes involved in the histone acetylation pathway were particularly altered (13/18). In OB group, *lysine acetyltransferases* and *Bromodomain-containing protein 2* were up-regulated, while most histone deacetylases were down-regulated. In WL group, the expression of only a subset of these genes was normalized.

Conclusions. This study highlights the high sensitivity of the epigenetic machinery gene expression, and particularly the histone acetylation pathway, to maternal obesity. These obesity-induced transcriptional changes could alter the placental and the hepatic epigenome, leading to FGR. Preconceptional weight loss appears beneficial to fetal growth, but some effects of previous obesity were retained in offspring phenotype.

Key words (10 max):

Maternal obesity, preconceptional weight loss, fetal growth restriction, epigenetic machinery, histone deacetylases (HDACs), lysine acetyltransferases (KATs), placenta, liver

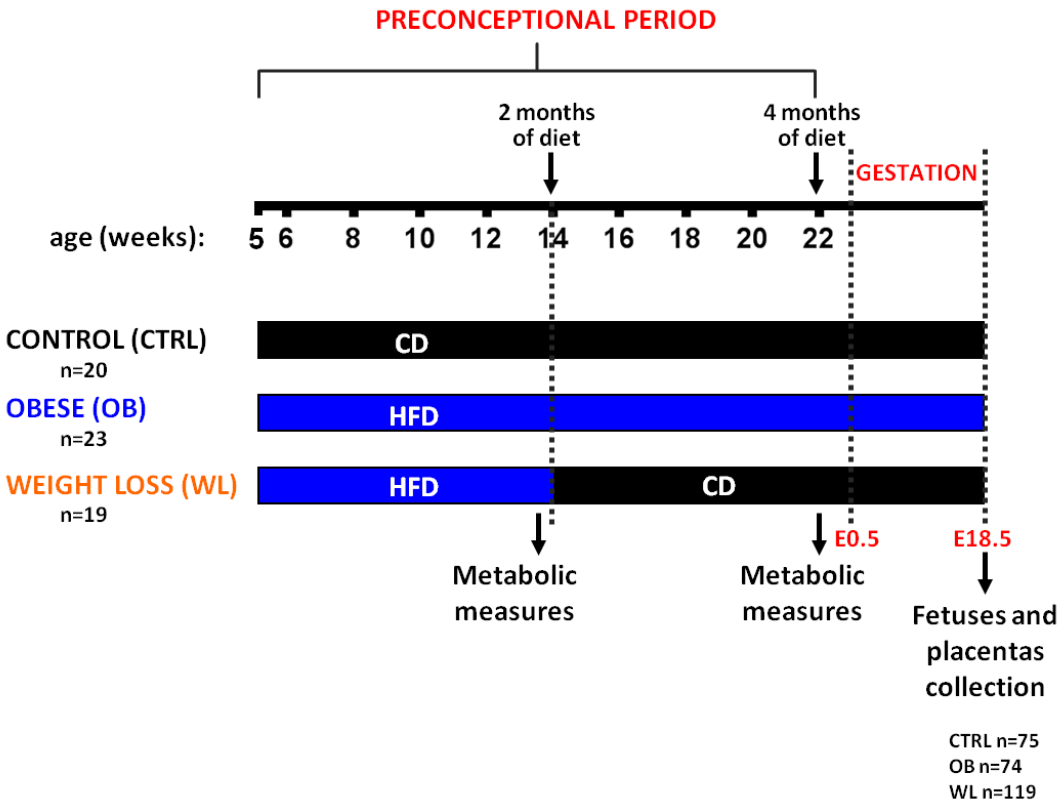


Figure 1. Experimental design.

C57BL/6j females were fed a control diet (CD) or a high-fat diet (HFD) throughout the study. After 2 months of diet, HFD was switched to CD for the Weight Loss group. After two and four months of diet, females' metabolic parameters (cholesterol, fasting glucose levels and glucose tolerance) were measured. After four months of preconceptional diet, females were mated with males under standard diet. Dams were sacrificed at E18.5, then fetuses and placentas were weighted and collected.

BACKGROUND

The worldwide prevalence of obesity in women was of 38% in 2013 (Ng, 2014). Obesity during pregnancy comprises increased risks for metabolic and obstetrical complications (e.g. gestational hypertension and diabetes, preeclampsia...), but also stillbirth, prematurity and congenital malformations (Lee and Koren, 2010). Fetal growth could be particularly impacted by maternal obesity. Maternal obesity is associated with macrosomia or, on the contrary, with fetal growth restriction (FGR) (Acosta et al., 2015; Gaudet et al., 2014; Liu et al., 2015; Rajasingam et al., 2009). FGR is associated with a high incidence of metabolic diseases in adulthood (Fernandez-Twinn and Ozanne, 2006; Hales et al., 1991), which is consistent with the *developmental origins of health and disease* (DOHaD) concept. This concept, also named 'developmental programming' or 'conditioning', states that environmental factors during early development could predispose an individual to chronic diseases (Hanson and Gluckman, 2014).

Despite the high incidence of FGR in obese women, little is known about the underlying mechanisms. FGR could result from insufficient oxygen supply due to disturbed vascularization, increased lipid accumulation and macronutrients transport in the placenta, crucial organ regulating appropriate fetal development (Hayes et al., 2012; Sferruzzi-Perri et al., 2013; Tarrade et al., 2013). The structure and the function of several organs could be affected in the offspring of obese mothers. *In utero* alterations of hepatic development and function by maternal obesity could disturb metabolic homeostasis (McCurdy et al., 2009; Plata et al., 2014). The effect of obesity on organogenesis and gene expression in growth-restricted fetuses needs further investigation; the current efforts are indeed focused on FGR induced by poor maternal nutrition (Swanson and David, 2015).

Modulation of offspring phenotype in response to maternal environment could be mediated by epigenetic mechanisms. Epigenetic marks (e.g. DNA methylation, histone posttranslational modifications) are stable but reversible covalent modifications that are regulated by a complex epigenetic machinery. Its actors "write", "erase" or "read" epigenetic marks, establishing the epigenome of the cell in conjunction with environmental factors. This epigenetic landscape is dynamic during development and controls gene expression patterns in a tissue-specific manner. Alterations of DNA methylation, histone modifications and, to a lesser extent, of their regulators were observed in relation to FGR caused by different factors (Attig et al., 2010; Delahaye et al., 2014; Fu, 2004; MacLennan, 2004; Park et al., 2008; Raychaudhuri et al., 2008). Epigenetic disturbances in growth-restricted fetuses in the context of maternal diet-induced obesity need further investigation. Maternal unbalanced nutrition and metabolic state could impact certain epigenetic enzymes in the developing organs of the offspring, affecting the epigenome (Donohoe and Bultman, 2012; Gabory et al., 2011). As epigenetic marks can be transmitted through generations of cell divisions, epigenetics has emerged as a plausible mechanism for long-term memory of environmental insults (Gabory et al., 2011; Waterland and Michels, 2007).

To counteract the negative effects of obesity on pregnancy outcomes, preconceptional weight loss is currently recommended to women with high body mass index (Paden and Avery, 2012). Nevertheless, very few studies have assessed the consequences of maternal weight loss on fetal growth (Forsum et al., 2013). In humans, weight loss between two pregnancies reduces the risk of macrosomia (Villamor and Cnattingius, 2006). However, in another cohort, weight loss between the age of 20 years and conception had a negative impact on birth weight (Diouf et al., 2011). Thus, the impact of maternal preconceptional weight changes on fetal growth and underlying epigenetic processes needs to be clarified. Currently there is no relevant mouse model to study this important issue for public health.

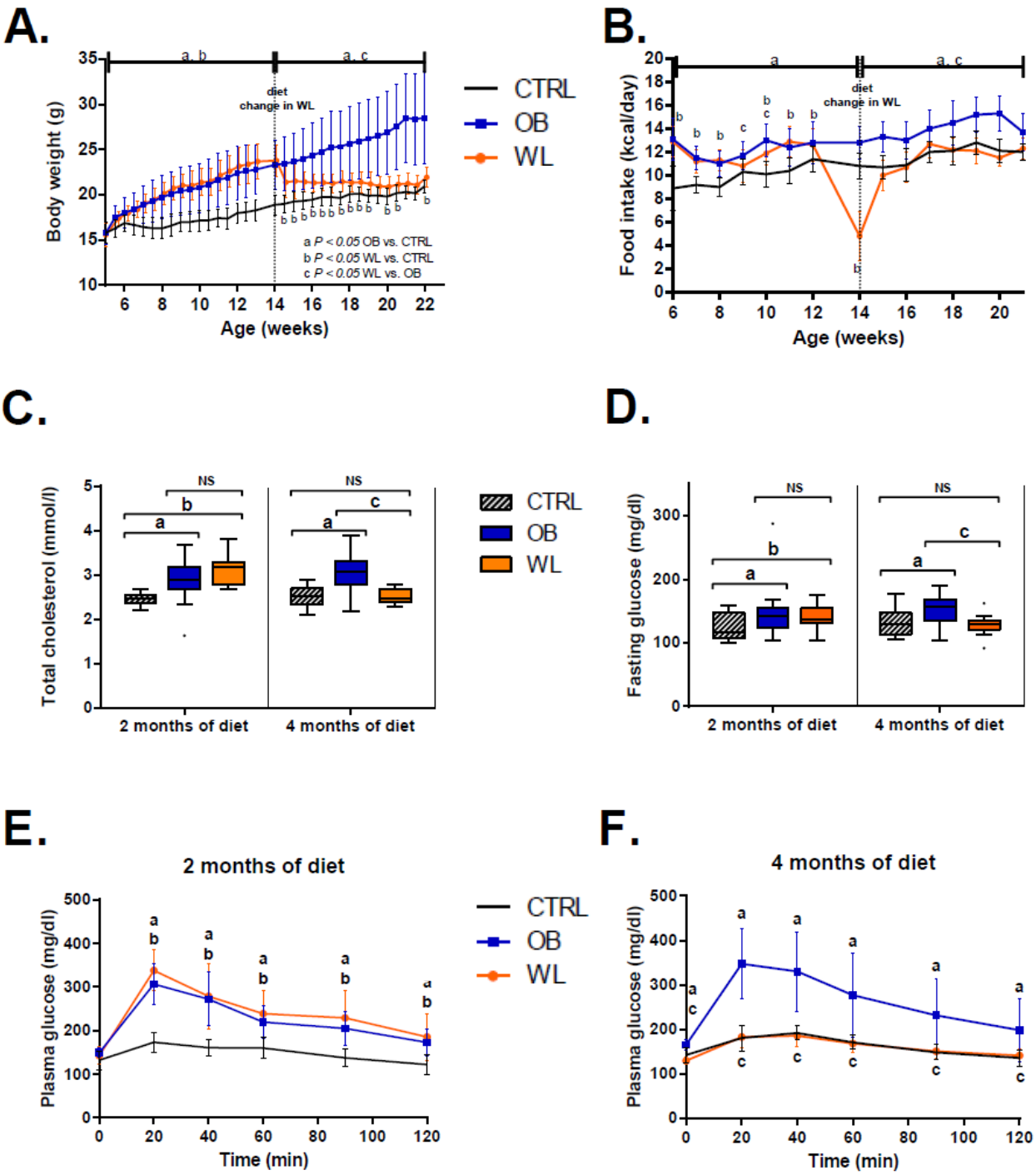


Figure 2. Body weight and metabolic parameters of OB and WL females during the preconceptional period.

(A) Body weight. (a) *P<0.05* OB *vs.* CTRL, (b) *P<0.05* WL *vs.* CTRL, (c) *P<0.05* WL *vs.* OB. n = 20 CTRL, 23 OB, 19 WL. **(B) Caloric intake**. (a) *P<0.001* OB *vs.* CTRL, (b) *P<0.001* WL *vs.* CTRL, (c) *P<0.05* WL *vs.* OB. n = 18-20 CTRL, 23 OB, 17-19 WL. **(C) Plasma cholesterol levels** after 2 and 4 months of preconceptional diet. NS – non significant, (a) *P<0.001* OB *vs.* CTRL, (b) *P<0.001* WL *vs.* CTRL, (c) *P<0.001* WL *vs.* OB. n = 17-19 CTRL, 22-23 OB, 19 WL. **(D) Fasting glucose level** after 2 and 4 months of preconceptional diet. NS – non significant, (a) *P<0.05* OB *vs.* CTRL, (b) *P<0.05* WL *vs.* CTRL, (c) *P<0.05* WL *vs.* OB. n = 17-19 CTRL, 23 OB, 19 WL. **(E) Plasma glucose levels during oral glucose tolerance test (OGTT) after 2 months of diet.** (a) *P<0.001* OB *vs.* CTRL, (b) *P<0.001* WL *vs.* CTRL, 11-12 females per group. **(F) Plasma glucose levels during OGTT after 4 months of diet.** (a) *P<0.001* OB *vs.* CTRL, (c) *P<0.001* WL *vs.* OB, 12 females per group. Data are expressed as mean ± St. Dev (A, B, E, F) or as Tukey boxplot (C, D).

Based on the observations that maternal obesity impairs feto-placental development, our aim was to examine the impact of maternal weight trajectories (obesity or weight loss) on the expression of epigenetic and metabolic genes. We showed that maternal obesity induced FGR, which was associated with an altered expression of histone acetylation modifiers in fetal liver and placenta. In contrast, correction of obesity during the preconceptional period by nutritional intervention normalized fetal weight and induced an adaptation at the transcriptional level. This study provides a novel mouse model for investigating the molecular mechanisms of obesity-induced FGR and highlights the sensitivity of the epigenetic machinery to maternal nutrition and metabolism.

RESULTS

High-fat diet (HFD) induced severe obesity in female mice; switching to a control diet (CD) induced weight loss and normalization of metabolic parameters

Female mice were fed either a CD (control females, CTRL) or a HFD (obese females, OB) for four months during the preconceptional period (Fig. 1). From the start of the diet and up to mating, OB females put on weight faster ($\beta = 0.52$, $P < 0.001$) and were heavier than CTRL females under a CD ($P < 0.001$, Fig. 2A). OB females weighted 27% and 36% more than CTRL females after two and four months of diet. After two months under a HFD, we replaced HFD by CD for a subset of the OB females to induce weight loss (WL females) (Fig. 1). The weight of WL females was lower than the weight of OB females as early as three days after CD initiation and afterwards ($P < 0.05$ at all time points, Fig. 2A). WL females tended to normalize their weight ($P = 0.105$ week 19.5, $P = 0.062$ week 21, $P = 0.051$ week 21.5, $P = 0.031$ week 22, WL vs. CTRL). However, they remained 5% heavier than CTRL females before mating.

The caloric intake of OB females was higher than the caloric intake of CTRL females for four months of the preconceptional period ($P < 0.001$, Fig. 2B) but OB and CTRL females had a similar food intake to body weight ratio (kcal / kg / day) (Additional file 1: Fig. S1). WL females drastically decreased their caloric intake right after the nutritional intervention ($P < 0.001$, WL vs. CTRL/OB; Fig. 2B) and normalized this parameter at 15 weeks and thereafter ($P = 0.15$, WL vs. CTRL; $P < 0.05$, WL vs. OB). Metabolic parameters were assessed after two months (at 14 weeks of age) and four months of diet (at 22 weeks of age) (Fig. 1). OB females were hypercholesterolemic, hyperglycemic and glucose intolerant compared to CTRL females ($P < 0.001$, $P < 0.05$ and $P < 0.001$ at each time point respectively, Fig. 2C, D, E, F). The nutritional intervention normalized these parameters in WL females.

In summary, OB females were obese, had an impaired glucose metabolism and hypercholesterolemia. Switching to a CD allowed complete restoration of all these parameters although WL females remained 5% heavier than CTRL females before mating.

Obese dams under HFD gained less weight at term of pregnancy

To determine the potential effects of maternal obesity and preconceptional weight loss on fetal outcomes, we mated CTRL, OB and WL females after 4 months of preconceptional diet with males under standard laboratory diet (Fig. 1). Preconceptional diet was maintained during pregnancy. OB dams had reduced total pregnant body weight gain and carcass weight compared with CTRL and WL dams at E18.5 ($P < 0.001$, Fig. 3A, B). There were no differences between WL and CTRL dams ($P = 0.83$ for total weight gain; $P = 0.56$ for carcass weight). The maternal group explained 29% of the variance in total body weight gain and 37% of variance in carcass

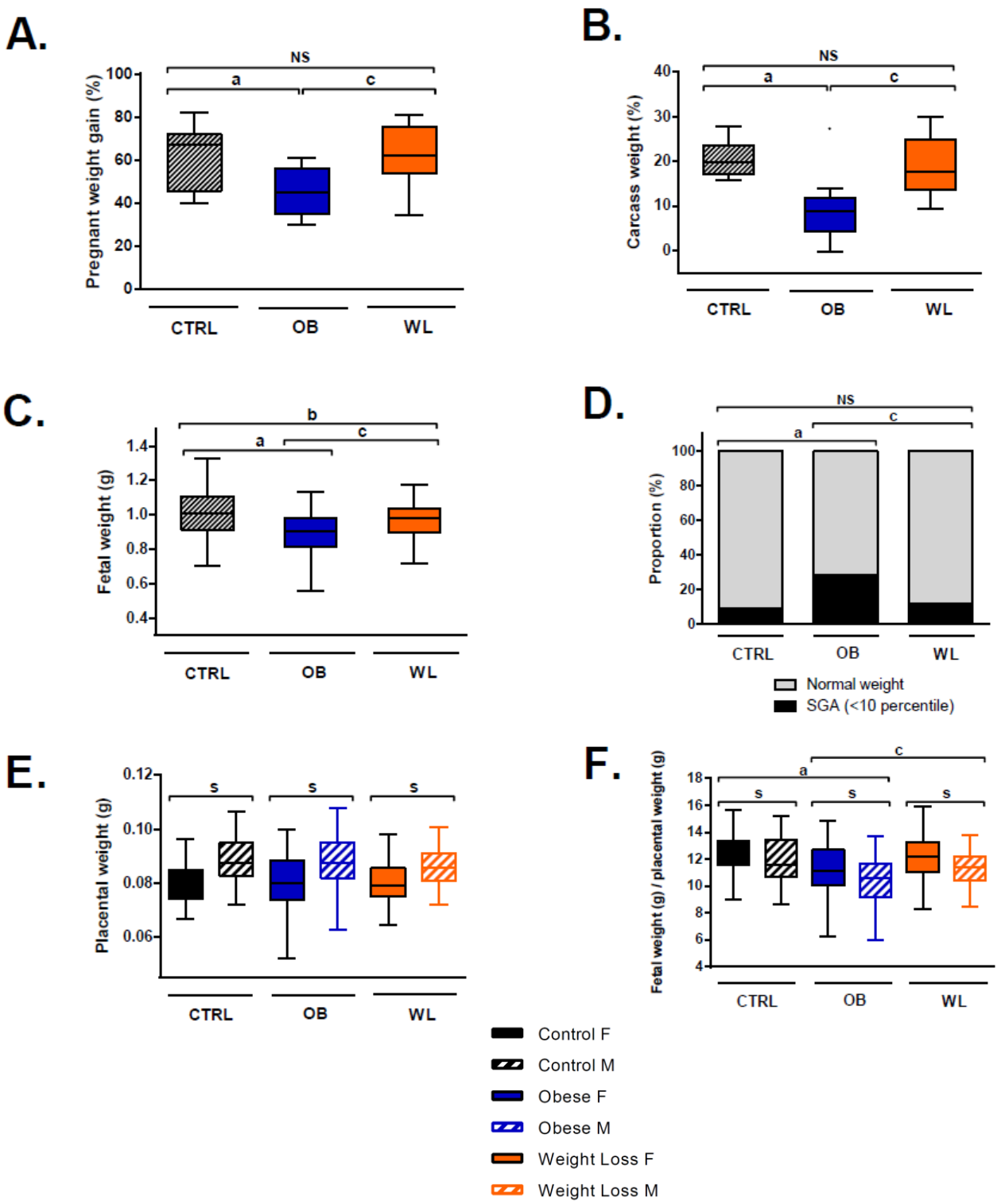


Figure 3. Body weight, fetal and placental weights in OB and WL dams at E18.5.

(A) Dams pregnant body weight gain (% of initial weight). NS – non significant, (a) *P<0.001* OB *vs.* CTRL, (c) *P<0.001* WL *vs.* OB. n = 13 CTRL, 11 OB, 17 WL. **(B) Dams carcass weight (% of initial weight) at sacrifice.** NS – non significant, (a) *P<0.001* OB *vs.* CTRL, (c) *P<0.001* WL *vs.* OB. n = 13 CTRL, 10 OB, 16 WL. **(C) Fetal weight.** (a) *P<0.001* OB *vs.* CTRL, (b) *P=0.005* WL *vs.* CTRL, (c) *P<0.001* WL *vs.* OB. Data from males and females were combined as there was no effect of sex on fetal weight. n = 75 CTRL, 74 OB, 119 WL. **(D) Proportion of small for gestational weight (SGA) fetuses.** NS – non significant, (a) *P<0.05* OB *vs.* CTRL, (c) *P<0.05* WL *vs.* OB. Data from males and females were combined as there was no effect of sex on fetal weight. CTRL (n = 7 SGA / 75 fetuses), OB (n = 21/74), WL (n = 14/119). **(E) Placental weight.** (s) *P<0.001* Males *vs.* Females. n = 36 CTRL F, 39 CTRL M, 35 OB F, 39 OB M, 61 WL F, 58 WL M. **(F) Fetus to Placenta weight ratio Index.** (a) *P=0.001* OB *vs.* CTRL, (c) *P<0.001* WL *vs.* OB, (s) *P=0.001* Males *vs.* Females. n = 36 CTRL F, 39 CTRL M, 35 OB F, 39 OB M, 61 WL F, 58 WL M.

weight at E18.5. OB and WL dams had increased litter size *vs.* CTRL dams at E18.5 ($P < 0.001$; CTRL: 5.5 ± 2.18, n = 14 litters; OB: 6.8 ± 1.99, n = 11; WL: 7.0 ± 2.26, n = 17). There was no difference in litter size between OB and WL dams ($P = 0.13$).

Maternal obesity induced fetal growth restriction, while preconceptional weight loss allowed partial restoration of fetal weight

As several studies identified sex-specific effects of maternal obesity on fetuses and placentas, we tested the effect of sex on fetal and placental weights (Clifton, 2010; Gabory et al., 2012; Mao et al., 2010; Tarrade et al., 2013). Sex did not affect fetal weight ($P = 0.17$) but affected placental weight and fetal weight-to-placental weight ratio index (FPI). Male placentas were heavier than female placentas ($P < 0.001$; difference in CTRL 11%, OB 10% and WL 7%) and FPI was lower in males than in females for all maternal groups ($P < 0.001$). We therefore adjusted for sex in the placental weight and FPI analysis only. Moreover, litter size affected fetal and placental weights ($P < 0.001$), and even if it explained only 4.6% and 7.7% of the variance respectively (Additional file 1: Fig. S2 and S3), we adjusted all analyses for this parameter.

We then examined the effect of maternal metabolism on fetal and placental weights at E18.5. We observed a 13% reduction of weight in fetuses of OB dams compared with CTRL dams ($P < 0.001$, Fig. 3C). Fetuses of WL dams were lighter (-5.3%) than fetuses of CTRL dams ($P = 0.005$, Fig. 3C), but heavier than fetuses of OB dams ($P < 0.001$). Overall, maternal group explained 15% of the variance in fetal weight. We determined the proportion of small for gestational age (SGA) fetuses, defined as fetal weight < 10^{th} percentile of CTRL population. There were 28.4% of SGA fetuses in OB dams, which was significantly more than in CTRL dams (Fisher's exact test, $P < 0.05$; Fig. 3D). In the WL dams, the percentage of SGA fetuses was not different from CTRL population (11.8%). Gaussian distributions of fetal weight in the three maternal groups are available in Additional file 1: Fig. S4.

There was no effect of maternal group on placental weight at E18.5 ($P = 0.46$, Fig. 3E). FPI, which represents placental efficiency, was reduced in fetuses of OB dams compared with CTRL and WL dams ($P < 0.001$, Fig. 3F). However, WL and CTRL dams had similar FPI ($P = 0.12$). Maternal group explained 12% of the variance in FPI. In female fetuses, there was a correlation between fetal and placental weight in all maternal groups (Pearson correlation test, adjusting for factor "mother": CTRL r = 0.50, $P_{adj} = 0.006$; OB r = 0.49; $P_{adj} = 0.006$; WL r = 0.36, $P_{adj} = 0.0063$; Additional file 1: Fig. S5). In male fetuses, we observed a correlation in WL (r = 0.45, $P_{adj} = 0.002$), but not in CTRL and OB groups (r = 0.28, $P_{adj} = 0.097$ and r = 0.1, $P_{adj} = 0.54$, respectively).

Thus, maternal chronic obesity caused FGR in both sexes and impaired placental efficiency. Preconceptional weight loss induced by nutritional intervention partly abolished this FGR. However, this restoration was not complete for fetal weight.

Maternal obesity altered gene expression in fetal liver and placental labyrinth, but not in junctional zone

To unravel the molecular mechanisms of the impact of maternal obesity and preconceptional weight loss in growth-restricted offspring, we assessed gene expression at E18.5 using custom TaqMan low-density arrays (TLDA). We tested the expression of 60 epigenetic machinery genes and 32 genes involved in metabolism or in development in three tissues: fetal liver, placental labyrinth and junctional zone (Additional file 2: Table S1). Based on the literature

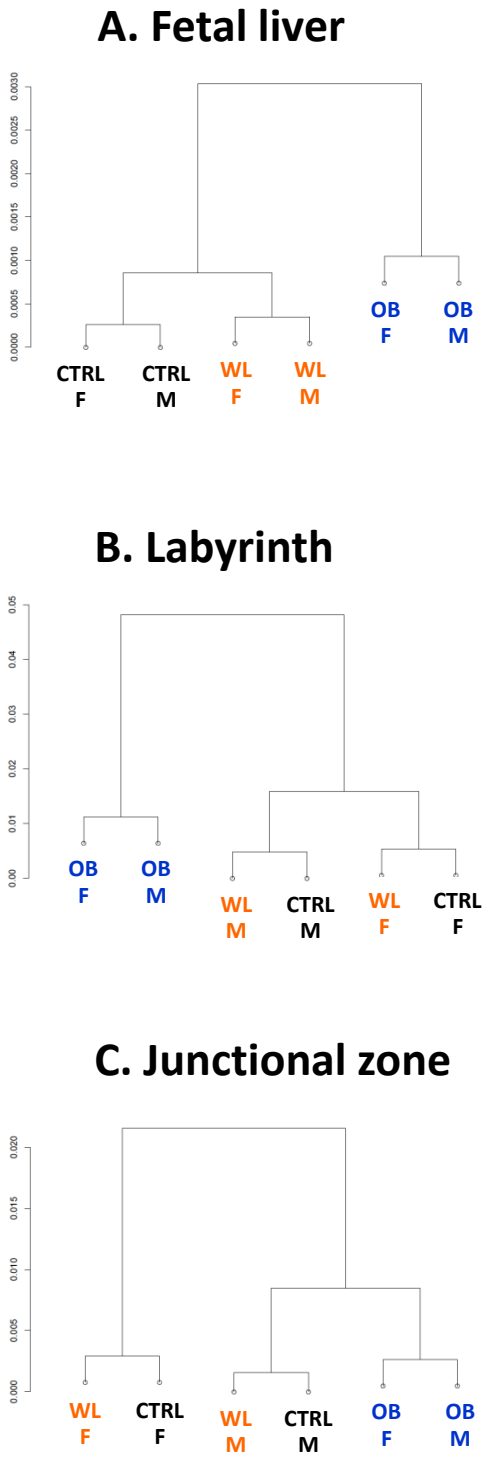


Figure 4. Hierarchical clustering of gene expression in fetal liver, placental labyrinth and junctional zone.

The clustering is based on the expression of 80 genes in liver **(A)**, 86 genes in labyrinth **(B)** and 89 genes in junctional zone **(C)** in CTRL, OB and WL females. Data are represented as Pearson correlation distance. Non-amplified genes were removed from analysis. F: females, M: males.

and our previous studies, these epigenetic genes were selected because of their implication in metabolic processes and obesity or type-2 diabetes (Attig et al., 2013; Gabory et al., 2012). Some of the metabolic genes assessed in our study are known targets of developmental conditioning and for a subset of these genes the epigenetic alterations are documented in this context. A description of the selection criteria of genes for the custom TLDA design is available in Additional file 3.

Hierarchical clustering based on mean gene expression revealed that gene expression was affected by maternal diet in liver and labyrinth: the OB group clustered away from CTRL and WL groups (Fig. 4A, B). The effect of obesity was weaker in junctional zone as OB males and females clustered with WL and CTRL males (Fig. 4C). In liver, groups clustered according to maternal diet while in placental layers, CTRL and WL groups clustered according to fetal sex. Thus, maternal obesity affected the mean expression of all tested genes in fetal liver and labyrinth, while maternal weight loss restored it.

We showed that 23 genes were significantly altered by maternal weight trajectories in at least one of three tissues (Table 1). The full list of mean expression level per gene and per group and adjusted p-values are presented in Additional file 4 (Table S2).

The expression of *Kdm5d* (*Jarid1d*) and *Uty* genes, which are localized on the Y chromosome, was restricted to male samples. Their paralogs located on the X chromosome (*Kdm5c/Jarid1c* and *Kdm5a/Utx*), and which partially escape X inactivation, were not differentially expressed between males and females. No effect of fetal sex on mRNA expression was observed for the other genes. Thus, we pooled male and female data from the same maternal group to assess the effect of maternal diet on gene expression.

Maternal obesity and weight loss altered the expression of epigenetic machinery genes in fetal liver

Maternal weight trajectories affected the transcription of nine epigenetic genes in liver. Expression of the histone deacetylase *Hdac2* was reduced in OB fetuses compared to CTRL fetuses (Table 1, Fig. 5E). On the contrary, expression of the lysine acetyltransferases *Kat2a* (*Gcn5*), *Kat3a* (*Creb binding protein*), *Kat6b* (*Myst4*) and *Kat13d* (*Clock*), the arginine methyltransferases *Prmt1* and *Prmt7*, the histone deacetylase *Hdac6* and the bromodomain protein *Brd2* was increased in fetuses from OB dams. Maternal weight loss induced various transcriptional responses of epigenetic machinery genes. On the one hand, *Brd2* expression remained increased in WL compared to CTRL fetuses, showing no normalization of its expression (Fig. 5G). Expression of *Hdac2* and *Kat3a* tended to remain altered in liver of WL fetuses ($P_{adj} = 0.065$ and $P_{adj} = 0.055$ respectively, WL vs. CTRL). On the other hand, expression of *Kat2a*, *Kat6b*, *Kat13d*, *Hdac6*, *Prmt1* and *Prmt7* was similar in WL and CTRL fetuses. Therefore, maternal weight loss restored the expression of some of the genes that were altered by maternal obesity, but not of all.

Among the investigated metabolic genes, only glucokinase (*Gck*) was affected. Its expression was reduced in the liver of OB fetuses compared to CTRL and normalized in WL fetuses (Table 1, Fig. 6A).

Maternal obesity and weight loss altered the expression of epigenetic machinery and metabolic genes in placenta

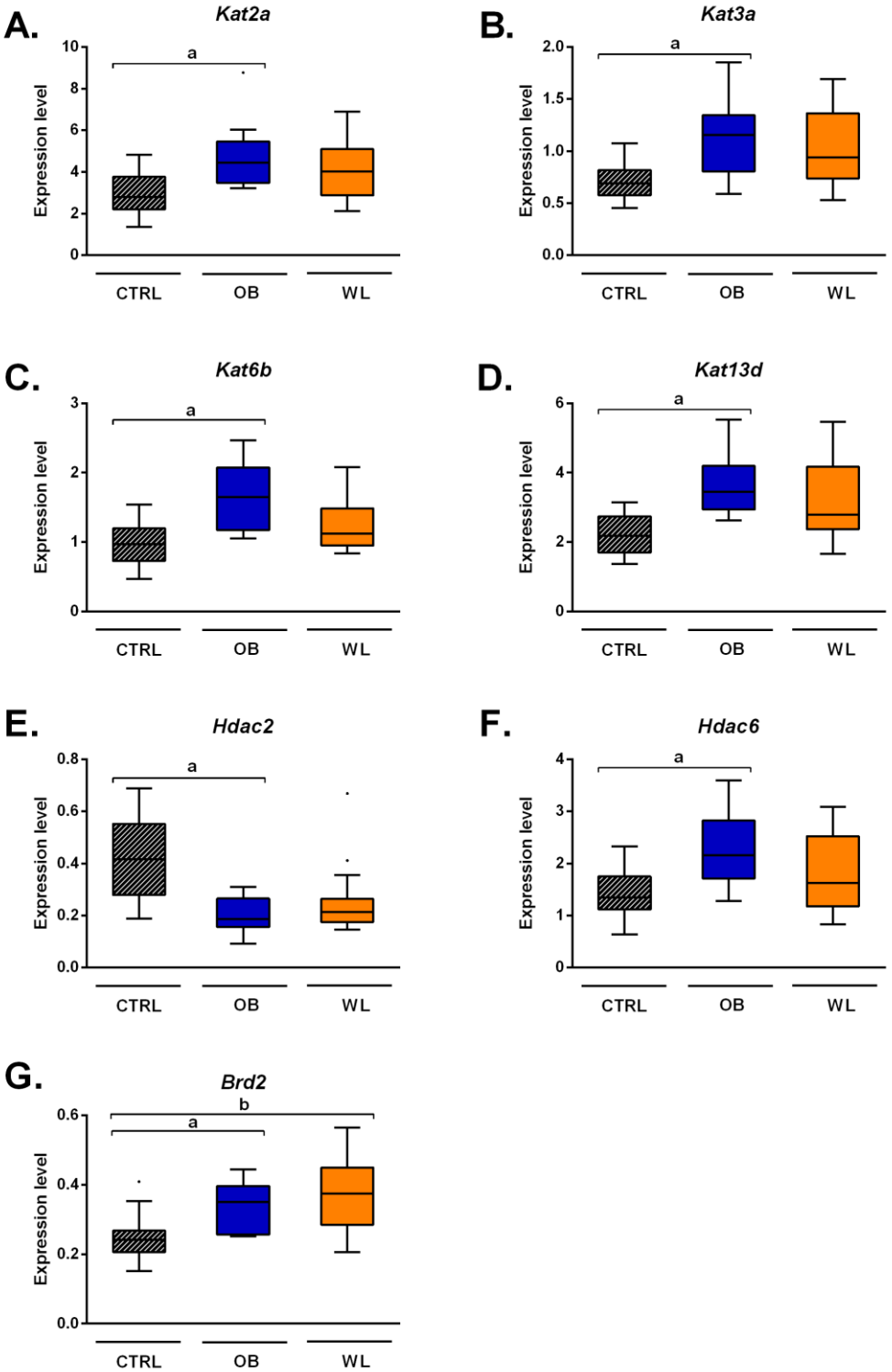


Figure 5. Genes implicated in histone acetylation are differentially expressed in fetal liver at E18.5.
We assessed the expression level of 60 genes of the epigenetic machinery using TaqMan low-density arrays. The expression of *Kat2a* **(A)**, *Kat3a* **(B)**, *Kat6b* **(C)**, *Kat13d* **(D)**, *Hdac2* **(E)**, *Hdac6* **(F)** and *Brd2* **(G)** was affected by maternal obesity. (a) $P_{adj} < 0.05$ OB *versus* CTRL, (b) $P_{adj} < 0.05$ WL *versus* CTRL, (c) $P_{adj} < 0.05$ WL *versus* OB. CTRL (n = 16), OB (n = 14), WL (n = 16).

Maternal obesity and weight loss altered the expression of twelve epigenetic genes in placental labyrinth and one gene in junctional zone (Table 1). Expression of the lysine acetyltransferases *Kat1* (*Hat1*), *Kat3b* (*Ep300*) and *Kat13b* (*Ncoa3*) was higher in labyrinth of OB dams compared to CTRL dams (Fig. 7A, B, E). Expression of the lysine methyltransferase *Kmt1d* (*Ehmt1*) and the histone deacetylases *Hdac3* and *Hdac10* was reduced in labyrinth of OB dams (Table 1, Fig. 7G, H). In WL dams, responses in placenta highly differed between the genes. There was no restoration of expression for *Kat1*, *Kat3b* and *Kat13b*. On the contrary, *Kmt1d*, *Hdac3* and *Hdac10* expression was restored.

Expression of *Sirtuin 4*, *Mecp2* and *Mbd5* was higher in WL than in OB labyrinth, but similar to CTRL (Table 1, Fig. 7I). Finally, some genes were not altered by maternal obesity but by maternal weight loss: *Kat3a* and *Brd2* were up-regulated and *Hdac2* was down-regulated in labyrinth; *Kat3b* was up-regulated in junctional zone (Fig. 7B, D, F, J). For these 4 genes, the medians and the distributions in OB group were intermediate between CTRL and WL group.

We showed that expression of hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1 (*Hsd11β1*), insulin receptor substrate 1 (*Irs1*) and tryptophan hydroxylase 1 (*Tph1*) was down-regulated in the placental labyrinth of OB dams (Table 1, Fig. 6B, C, D). There was no difference between WL and CTRL for these metabolic genes. None of the investigated metabolic or developmental genes were affected in the junctional zone.

Thus, the expression of 30% of epigenetic machinery genes (18 out of 60 studied) was altered by maternal weight trajectories in three tissues. Fifteen percents of genes (9/60) were differentially expressed in fetal liver, 20% (12/60) in labyrinth and 1.7% (1/60) in junctional zone. The histone acetylation pathway (KATs, HDACs and BRDs) was particularly altered: 78% of differentially expressed genes in liver (7/9), 75% in labyrinth (9/12) and the only gene in junctional zone.

Maternal obesity had an important effect on the expression of metabolic and epigenetic genes in fetal liver and placental labyrinth, but not in junctional zone. Maternal preconceptional weight loss allowed a global restoration of transcription to CTRL levels. However, the expression of certain genes (for example, *Kat1*, *Kat3b* and *Kat13b* in labyrinth and *Brd2* in liver) was not restored.

DISCUSSION

In the present study, we showed that maternal chronic obesity lead to FGR at E18.5, while the weight loss induced by a nutritional intervention performed in preconceptional period allowed a partial fetal weight restoration. These phenotypic changes were associated with a transcriptional response in fetal liver and placental labyrinth: we showed that 23 genes were significantly altered by maternal weight trajectories in at least one of three tissues between two maternal groups (Fig. 8). Our results identified that epigenetic machinery genes expression is clearly sensitive to maternal weight trajectories, especially for genes involved in histone acetylation.

Maternal obesity induced a FGR associated with altered expression of epigenetic modifiers in fetal liver and placental labyrinth

In our model, OB mice were severely obese and presented the characteristics of metabolic syndrome after four months of HFD). This resulted in fetal growth restriction (FGR) at E18.5, which is consistent with the previous studies in mice (King et al., 2013b; Plata et al., 2014;

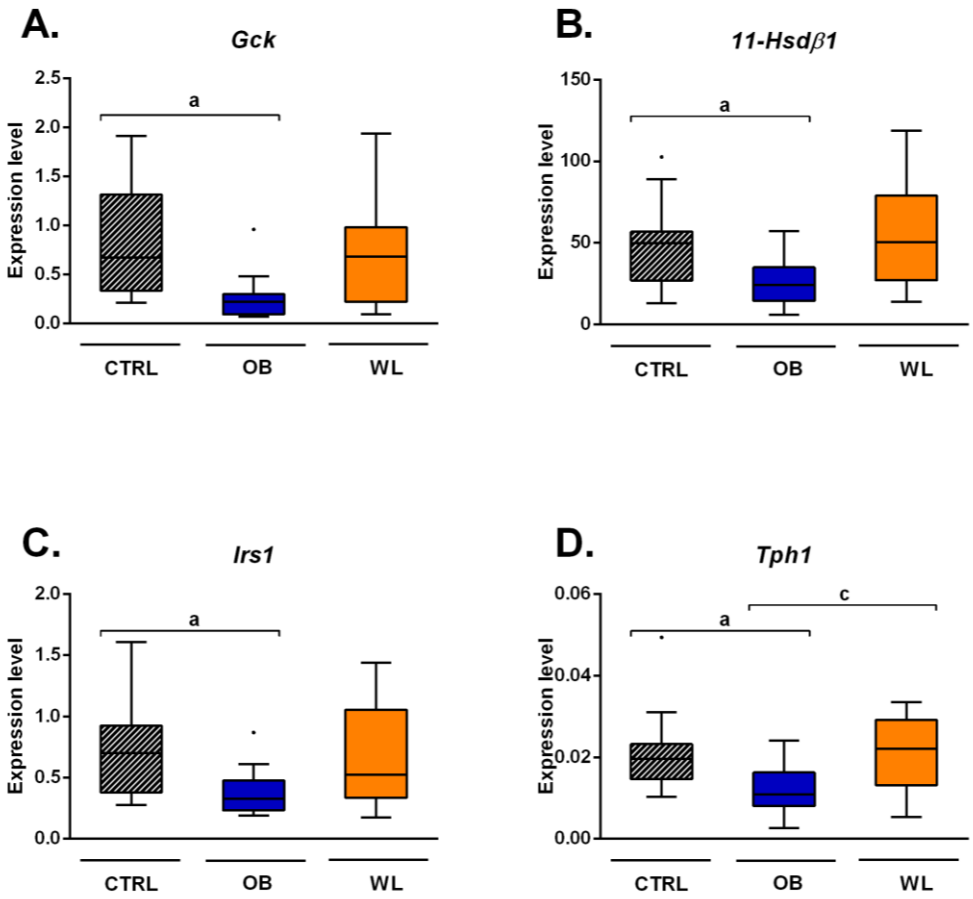


Figure 6. Maternal weight trajectories affect the expression of genes implicated in metabolism.
We assessed the expression level of 32 genes implicated in metabolism or development using TaqMan low-density arrays. The expression of *glucokinase* **(A)** and *leptin receptor* **(B)** in fetal liver and *hydroxysteroid 11-β dehydrogenase 1* **(C)**, *insulin receptor substrate 1* **(D)** and *tryptophan hydroxylase 1* **(E)** in placental labyrinth was affected by maternal obesity or weight loss at E18.5. (a) $P_{adj} < 0.05$ OB *versus* CTRL, (b) $P_{adj} < 0.05$ WL *versus* CTRL, (c) $P_{adj} < 0.05$ WL *versus* OB. CTRL (n = 16), OB (n = 14), WL (n = 16).

Sasson et al., 2015; Sferruzzi-Perri et al., 2013). However, in some mouse models, fetuses from OB dams displayed an overgrowth, and it associated with altered placental transport (Jones et al., 2009; Rosario et al., 2015). These discrepancies could be explained by differences in diet composition, especially by high sugar content. In humans and rats, maternal obesity also associates with an elevated fetal weight (Acosta et al., 2015; Gaudet et al., 2014; Strakovsky et al., 2011). As maternal obesity associates also with FGR in humans, our study provide a mouse model for investigation of the molecular mechanisms of this pathology, which remain unknown (Rajasingam et al., 2009).

Maternal HFD alters hepatic function and structure in the fetus (McCurdy et al., 2009; Plata et al., 2014). In OB dams, we report reduced transcription of *Gck*, the enzyme controlling the synthesis of hepatic glycogen and implicated in type 2 diabetes. *Gck* expression could remain reduced after birth and lead to impaired glucose metabolism (Lane et al., 2002; Postic et al., 1999). Placental function is also affected by obesity or HFD (Dube et al., 2012; Jones et al., 2009; Mele et al., 2014; Rosario et al., 2015; Sferruzzi-Perri et al., 2013; Tarrade et al., 2013). In our study, *Hsd11β1*, *Irs1* and *Tph1* were down-regulated in labyrinth of OB dams, suggesting that alterations of placental function could contribute to FGR. Hydroxysteroid dehydrogenases 11β control the passage of glucocorticoids from mother to fetus. In human, placental expression of *HSD11β1* is associated with birth weight (Muramatsu-Kato et al., 2014); placental *HSD11βs* expression is reduced in SGA neonates (Struwe et al., 2007). Impaired placental insulin signaling is associated with obesity; gestational diabetes mellitus or IUGR (Colomiere et al., 2009; Street et al., 2011). Insulin regulates placental growth, vascularization, glycogen and lipid storage (Hiden et al., 2009). Reduced expression of *Irs1* in OB dams could lead to insulin resistance in placental labyrinth and affect these processes. Finally, down-regulation of *Tph1* could impair the transformation of maternal tryptophan to serotonin, a process that is necessary for proper fetal brain development (Bonnin et al., 2011; Goeden et al., 2013).

Metabolic diseases are associated with alteration of epigenetic marks (Martinez et al., 2014). A key finding in this study is that maternal obesity has a major impact on the expression of epigenetic regulators in fetal liver and placental labyrinth at term. The actors of the histone acetylation pathway were particularly affected. Some families of epigenetic modifiers were not affected by obesity in our study: DNA methyltransferases, TET proteins, methyl binding proteins and lysine demethylases. But this does not preclude changes at previous developmental stages.

Transcript levels of arginine methyltransferases *Prmt1* and *Prmt7* were up-regulated in liver of OB fetuses. Prmts, which catalyze the methylation of arginine histone residues, are implicated in hepatic gluconeogenesis (Han et al., 2014). Prmt1 dimethylates the arginines on FOXO1 (forkhead box protein O1), inducing the translocation of this transcription factor into the nucleus and activation of its target metabolic genes (Yamagata et al., 2008). No implication of Prmt7 in hepatic metabolism or development is known. Implications of the histone arginine methyltransferase activity in FGR or in response to maternal nutritional environment remain to be determined. Only one of the seven studied lysine methyltransferases was differentially expressed in our study: *Kmt1d* was down-regulated in labyrinth of OB dams. No implication of this lysine methyltransferase in placental biology has yet been reported.

Preconceptional weight loss is beneficial to fetal growth and induces an adaptation at the transcriptional level

To our knowledge, it is the first mouse model to study the effects of preconceptional weight loss induced by nutritional intervention on fetal growth and on the transcriptional response in

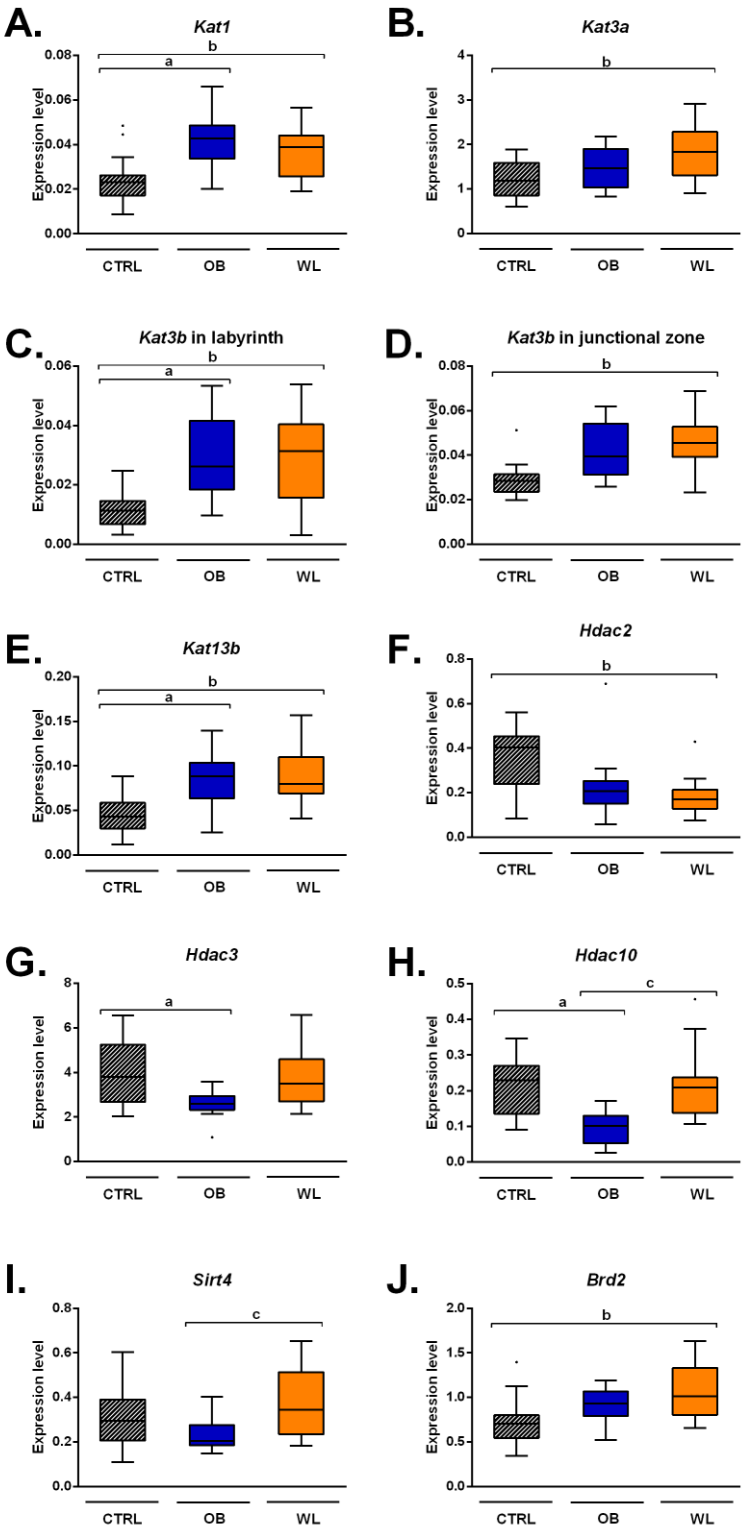


Figure 7. Genes implicated in histone acetylation are differentially expressed in the placenta at E18.5.

We assessed the expression level of 60 epigenetic machinery genes using TaqMan low-density arrays. The expression of *Kat1* **(A)**, *Kat3a* **(B)**, *Kat3b* **(C)**, *Kat13b* **(D)**, *Hdac2* **(E)**, *Hdac3* **(F)**, *Hdac10* **(G)**, *Sirt4* **(H)** and *Brd2* **(I)** was affected by maternal obesity and weight loss in labyrinth. Only *Kat3b* **(J)** was differentially expressed in junctional zone. (a) $P_{adj} < 0.05$ OB *versus* CTRL, (b) $P_{adj} < 0.05$ WL *versus* CTRL, (c) $P_{adj} < 0.05$ WL *versus* OB. CTRL (n = 16), OB (n = 14), WL (n = 16).

fetal and placental tissues. Despite the normalization of maternal phenotype at conception (Fig. 2), fetuses born to WL dams presented weight and transcription differences compared with fetuses from CTRL dams.

The nutritional intervention and preconceptional weight loss partially restored the FGR observed in OB fetuses. Interestingly, the proportion of SGA fetuses was comparable to the proportion of SGA fetuses from CTRL dams. The first human cohort studies point at a rather beneficial effects of maternal weight loss on fetal outcomes, namely a lower risk of LGA infants compared to obese patients (Bogaerts et al., 2015; Forsum et al., 2013; Villamor and Cnattingius, 2006). In sheep, maternal obesity induced macrosomia and elevated heart, liver and perirenal adipose tissue weights. A nutritional intervention normalized the fetal and organ weights (Tuersunjiang et al., 2013). In rat studies, there was no effect of maternal obesity nor weight loss on fetal weight (Srinivasan, 2005; Zambrano et al., 2010). Thus, preconceptional weight loss appears beneficial for fetal growth, counteracting the adverse effects of maternal obesity. We could expect a complete restoration of fetal weight with longer period of CD application in our model.

In our expression study, we observed different profiles of transcriptional response to maternal weight loss; mRNA levels of a subset of genes were completely or partially normalized, while other genes did not differ between OB and CTRL groups. Overall, the placenta and fetal liver in WL group presented an adaptation in gene expression with high individual variability for some genes.

Finally, some genes were differentially expressed only in WL group: the methyl-DNA binding proteins *Mecp2* and *Mbd5* were up-regulated in labyrinth of WL compared with CTRL and OB. These DNA methylation "readers" are implicated in obesity (MeCP2) and glucose homeostasis regulation (MBD5) (Du et al., 2012; Fyffe et al., 2008; Wang et al., 2014). In the placenta of calorie-restricted mice, MeCP2 binding to hypermethylated CpG island of *Glut3* was enhanced (Ganguly et al., 2014).

We observed a restoration of *Gck* mRNA levels in fetal liver of WL offspring, and a restoration of *Hsd11β1*, *Irs1* and *Tph1* levels in placental labyrinth. Similar results were obtained for *Hsd11β1* in a sheep model of maternal obesity and nutritional preconceptional intervention (Nicholas et al., 2013a). The normalization of expression of these genes involved in glucose, glucocorticoid and serotonin metabolism and insulin signaling by maternal weight loss could abolish the negative effects induced by maternal obesity.

In this study, maternal obesity, despite the nutritional intervention prior to conception, was retained in the fetal phenotype and gene expression. WL females were severely obese throughout their puberty, when HFD consumption and high adiposity could have affected their gonads. Obesity causes lipid accumulation, mitochondrial dysfunction and chromosomal abnormalities in oocytes, as well as a modification of follicular liquid content (Robker et al., 2009; Wu et al., 2010). This can induce FGR and developmental defects (Luzzo et al., 2012). The negative consequences of maternal obesity could be transmitted, at least in part, via alteration of oocyte function and epigenome. Methylation levels of genes involved in lipid metabolism could be transmitted to the blastocyst and to adult progeny in mice (Wei et al., 2015). In another study, maternal HFD and obesity induces hypermethylation of *Lep* and hypomethylation of *Pparα* in the oocytes and in the liver of adult offspring (Ge et al., 2013). The oocyte epigenetic machinery and acetylation levels are sensitive to maternal diabetes (Ding et al., 2012). Therefore, in our study, despite the normalization of metabolism by nutritional intervention, some epigenetic marks affected by obesity could be retained in WL group. Weight loss could also trigger the addition of novel epigenetic marks in oocytes. These epigenetic

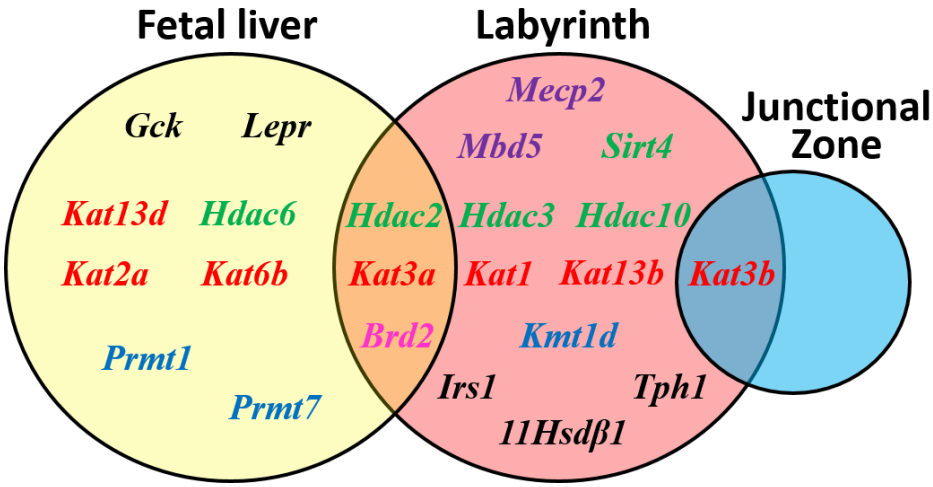


Figure 8. Differentially expressed genes in fetal liver, placental labyrinth and junctional zone.

Venn diagram shows the names of the genes altered by maternal weight trajectories in three tissues. Metabolic genes are represented in black, methyl CpG-binding proteins in violet, arginine methyltransferases and lysine methyltransferases in blue, histone deacetylases in green, lysine acetyltransferases in red and bromodomain containing proteins in pink.

alterations could provide a mechanism that explains the “memorization” of an obesogenic environment.

The balance between "writers" and "erasers" of histone acetylation could play a role in obesity-induced FGR

In our expression profiling, we studied the transcription of 29 genes involved in histone acetylation (KATs, HDACs and BRDs), out of 60 epigenetic genes (48%). Remarkably, 78% of differentially expressed epigenetic genes in fetal liver (7 out of 9) and 75% in labyrinth (9 out of 12) are involved in histone acetylation. The only differentially expressed gene in junctional zone (*Kat3b*) is also involved in acetylation pathway. The three genes in common between liver and labyrinth and the gene differentially expressed in the two placental layers are involved in histone acetylation. Seven members of KAT family, “writers” of lysine acetylation, were up-regulated in fetal liver and placental labyrinth of OB dams. Interestingly, their expression was restored in fetal liver (*Kat2a*, *Kat3a*, *Kat6b* and *Kat13d*) of WL dams, but there was clearly no restoration in labyrinth (*Kat1*, *Kat3a*, *Kat3b* and *Kat13b*). Moreover, the expression of the majority of HDACs (*Hdac2*, *Hdac3* and *Hdac10*) that mediate the opposite reaction, was reduced in fetal liver and placental labyrinth of OB dams.

Therefore, we observed a disruption in the balance between the expression of “writers” and “erasers” of lysine acetylation in offspring from obese mother at term of gestation (Table 2). This could lead to an increased level of histone acetylation in FGR offspring of OB dams. In primates, global levels of H3K14ac were up-regulated in liver at term and after birth in the case of chronic maternal HFD consumption (Aagaard-Tillery et al., 2008). This hyperacetylation is consistent with reduced expression and enzymatic activity of Hdac1 and Sirt1 (Suter et al., 2012). In mice, maternal HFD increased the level of H3K14ac in fetal liver at E18.5 and this effect persisted after birth (Suter et al., 2014). Interestingly, expression of *Hdac1*, *Hdac3*, *Sirt1* was unaltered at the same stage. In rats, the *Pepck* gene implicated in gluconeogenesis is enriched in H4ac in liver of fetuses from dams under HFD, which is consistent with its high expression and fetal hyperglycaemia (Strakovsky et al., 2011). In diabetic mice, the expression of *KATs* was up-regulated in oocytes, while the expression of *HDACs* was down-regulated, as in our study, and the dynamics of acetylation at different lysine residues was disturbed during oocyte maturation (Ding et al., 2012).

These studies mainly tested the expression of acetylation-related genes. One purpose of our study was to analyze the expression of different families of epigenetic modifiers. The only other extensive report focused on 67 epigenetic modifiers in transcriptomic data from fetal lung, liver, kidney, heart and placenta of IUGR fetuses, induced by low-protein maternal diet in rats (Vaiman et al., 2011). Histone acetylation modifiers were unchanged while DNMTs were differentially expressed in fetal liver and HDACs in lung. Therefore, maternal undernutrition or overnutrition could affect different biological processes, yet both resulting in FGR.

Some of the differentially expressed KATs or HDACs revealed in our study are implicated in metabolic processes and associated with metabolic diseases, according to different studies in mice and humans. *Hdac2* and *Hdac6* are involved in adipogenesis (Yoo et al., 2006). HDAC3 is an important regulator of hepatic lipid metabolism in a circadian manner and invalidation of its gene induces hepatic steatosis (Feng et al., 2011). Single nucleotide polymorphisms in *KAT13D* (*CLOCK*) gene are associated with obesity and weight loss success in humans (Garaulet et al., 2010; Sookoian et al., 2008). CLOCK is a major circadian regulator: in mice, its mutation disrupts the circadian rhythms and induces a metabolic syndrome (Turek, 2005). *Kat13b* is involved in energy expenditure and therefore obesity (Coste et al., 2008). *Kat3a* is

Table 1. Differentially expressed genes in fetal liver, placental labyrinth and junctional zone at E18.5.

Data are represented as mean expression levels ± St.Dev. When the p-value was significant an arrow showing the sense of variation was added (↘ - down-regulation, ↗ - up-regulation).

Tissue	Gene	CTRL group	OB group	WL group	P-value		
					OB *vs.* CTRL	WL *vs.* CTRL	WL *vs.* OB
Fetal Liver	***Kat2a (Gcn5)***	2.92 ± 0.90	4.77 ± 1.48	4.14 ± 1.51	↗ **0.004**	0.118	0.622
	Kat3a (Crebbp)	0.71 ± 0.19	1.14 ± 0.34	1.04 ± 0.37	↗ **0.008**	0.055	0.745
	Kat6b (Myst4)	0.97 ± 0.29	1.65 ± 0.48	1.26 ± 0.41	↗ **0.004**	0.209	0.209
	Kat13d (Clock)	2.19 ± 0.59	3.67 ± 0.89	3.16 ± 1.23	↗ < **0.001**	0.307	0.445
	Hdac2	0.43 ± 0.17	0.20 ± 0.07	0.26 ± 0.13	↘ **0.004**	0.065	0.496
	Hdac6	1.44 ± 0.43	2.29 ± 0.71	1.78 ± 0.74	↗ **0.012**	0.445	0.339
	Brd2	0.25 ± 0.07	0.34 ± 0.07	0.37 ± 0.10	↗ **0.039**	0.024	0.731
	Prmt1	0.50 ± 0.15	0.78 ± 0.21	0.61 ± 0.23	↗ **0.008**	0.431	0.279
	Prmt7	7.1 ± 2.6	11.6 ± 3.9	8.5 ± 3.0	↗ **0.016**	0.496	0.166
	Gck	0.81 ± 0.56	0.26 ± 0.24	0.76 ± 0.61	↘ **0.031**	0.940	0.088
	Lepr	0.22 ± 0.09	0.25 ± 0.07	0.17 ± 0.05	0.637	0.377	↘ **0.039**
Labyrinth	***Kat1 (Hat1)***	0.024 ± 0.011	0.041 ± 0.013	0.037 ± 0.010	↗ **0.012**	↗ **0.029**	0.463
	Kat3a (Crebbp)	1.22 ± 0.42	1.49 ± 0.43	1.84 ± 0.60	0.215	↗ **0.029**	0.192
	Kat3b (Ep300)	0.012 ± 0.006	0.030 ± 0.014	0.029 ± 0.014	↗ **0.003**	↗ **0.006**	0.907
	Kat13b (Ncoa3)	0.045 ± 0.022	0.084 ± 0.033	0.087 ± 0.028	↗ **0.017**	↗ **0.003**	0.871
	Hdac2	0.35 ± 0.15	0.23 ± 0.15	0.18 ± 0.08	0.124	↘ **0.014**	0.448
	Hdac3	4.03 ± 1.41	2.60 ± 0.62	3.81 ± 1.43	↘ **0.021**	0.797	0.053
	Hdac10	0.22 ± 0.08	0.10 ± 0.05	0.22 ± 0.10	↘ **0.003**	0.978	↗ **0.003**
	Sirt4	0.32 ± 0.14	0.23 ± 0.07	0.37 ± 0.16	0.124	0.478	↗ **0.046**
	Brd2	0.73 ± 0.26	0.91 ± 0.18	1.06 ± 0.31	0.124	↗ **0.036**	0.266
	Kmt1d (Ehmt1)	2.09 ± 0.74	1.34 ± 0.37	2.50 ± 1.15	↘ **0.029**	0.402	↗ **0.017**
	Mbd5	0.031 ± 0.010	0.022 ± 0.007	0.035 ± 0.013	0.053	0.480	↗ **0.021**
	Mecp2	0.035 ± 0.012	0.029 ± 0.010	0.045 ± 0.012	0.247	0.112	↗ **0.007**
	Hsd11β1	49.7 ± 25.5	26.1 ± 13.8	52.1 ± 32.0	↘ **0.046**	0.892	0.065
	Irs1	0.71 ± 0.36	0.38 ± 0.19	0.65 ± 0.41	↘ **0.043**	0.777	0.124
	Tph1	0.021 ± 0.010	0.012 ± 0.006	0.021 ± 0.009	↘ **0.033**	0.978	↗ **0.04951**
Junctional Zone	***Kat3b (Ep300)***	0.029 ± 0.008	0.042 ± 0.012	0.045 ± 0.012	0.101	↗ **0.040**	0.743

implicated in diabetes by acting on the transcription of gluconeogenetic genes (Zhou et al., 2004). Kat3b regulates the expression of genes involved in lipogenesis and gluconeogenesis in liver (Bricambert et al., 2010). Thus, KATs and HDACs have important roles in metabolism and their alteration in obese offspring could indicate major changes in placental and hepatic function.

Bromodomain proteins recognize acetylated lysines and recruit other enzymes to form a multiprotein complex that further enhances transcriptional activity (Marmorstein and Zhou, 2014). Brd2 is a negative regulator of adipogenesis via transcriptional repression of *Pparγ*. Heterozygous mice invalidated for *Brd2* are obese and have surprisingly better glucose tolerance (Wang et al., 2010). The meaning for the increased *Brd2* expression in OB group observed in our study (Table 2, Figures 5, 6) remains to be determined.

Overall, our results show that epigenetic machinery genes are sensitive to maternal environment and that histone acetylation pathway is particularly affected. Epigenetic modifiers should be considered when studying the offspring's response to maternal metabolic disturbances.

Limitations and strength of the study

In this study, we used a mouse model of obesity-induced FGR, relevant for the investigation of epigenetic mechanisms underlying this pathology, in relation to feto-placental development. This is also the first report of the effects of preconceptional maternal weight loss induced by nutritional intervention on feto-placental growth and gene expression at term. This important contribution highlights the consequences of maternal body weight changes on fetal outcomes and molecular processes, providing evidence to the elaboration the preconceptional counseling for obese women.

In our expressional screening, we used a high-output RT-qPCR technique that simultaneously assessed 96 transcripts. We have studied 60 epigenetic machinery genes, which gives a large overview of the maternal impact on epigenetic regulation processes. These genes were chosen based on their implication in metabolic processes or on our previous study where the effect of maternal HFD during pregnancy showed an altered expression of seven epigenetic genes (Gabory et al., 2012). Our goal was to study different families of epigenetic modifiers (DNMTs, TETs, KMTs, KDMs, KATs, HDACs, BRDs) because the literature was particularly focused on histone acetylation and DNA methylation. However, some interesting epigenetic families were not taken into account, like the genes encoding proteins from the Polycomb or Tritorax families, or nucleosome remodelers, such as SWI/SNF. The expression of these genes has never been studied in the context of obesity. Moreover, the expression changes reported here are transcript levels. There may be differences between mRNA levels and proteins level or enzymatic activity. In other studies, Hdac1 and Sirt1 mRNA and protein levels were both affected in the same direction in the context of maternal obesity or HFD (Aagaard-Tillery et al., 2008; Suter et al., 2012).

The vast majority of expression studies are performed in whole placentas, but epigenetic processes may not be the same in different parts of the placenta since they have different functions and cellular populations (Gabory et al., 2012; Gheorghe et al., 2010; Mao et al., 2010). The originality of our study was to compare different parts of the placenta - labyrinth and junctional zone - which have different structure, cellular content and function. The labyrinth is a zone of active exchange between maternal and fetal blood, while the junctional zone provides storage of nutrients that are necessary for the fetus and hormone production (Georgiades et al., 2002). We observed a striking difference in terms of gene expression in these two placental layers, with a smaller transcriptional response in junctional zone. A plausible explanation could

Table 2. Maternal weight trajectories affect the expression of genes involved in histone acetylation.

↑ up-regulation; ↓ down-regulation; = no significant difference; KAT: lysine acetyltransferases; HDAC: histone deacetylases; BRD: bromodomain-containing proteins.

	Writers: KATs		Erasers: HDACs		Readers: Brd2	
	OB	WL	OB	WL	OB	WL
Fetal liver	↑	Restoration	↑ or ↓	No restoration (trend) / Restoration	↑	No restoration
Labyrinth	↑	No restoration	↓	No restoration / Restoration	=	Up-regulation
Junctional zone	=	Up-regulation	–	–	–	–

be that the labyrinth, due to its intimate contact with maternal blood, is more reactive at the transcriptional level, in order to adapt to a dynamic environment. Interestingly, the only affected gene in junctional zone (*Kat3b*) is differentially expressed in a similar pattern in labyrinth. KAT3b is implicated in preeclampsia, a disease associated with placental insufficient vascularization, and with the regulation of placental *Hsd11β2* expression via elevated H3K9ac and H3K27ac in humans (Li et al., 2013; Vaiman et al., 2013). Our study highlights a potential important role of KAT3b in placenta in response to maternal metabolism. Its epigenetic targets need further investigation.

CONCLUSIONS

In our mouse model, maternal obesity induced FGR and reduced placental efficiency at term. These phenotypic changes were associated with alterations of the expression of genes involved in epigenetic processes in fetal liver and placenta. Nutritional intervention during the preconceptional period allowed maternal weight loss and the normalization of metabolic parameters at mating. In the offspring of WL mothers, fetal growth was partially restored and the transcription was normalized only for a subset of genes affected by maternal obesity. Thus, the history of maternal obesity has an impact on fetal growth and transcriptional activity. The epigenetic machinery is highly sensitive to maternal weight trajectories, which could lead to an altered epigenome in the offspring. Histone acetylation modifiers represented a major part of the differentially expressed genes in OB and WL groups, that could account for reminiscence of the obese status.

This study highlights the importance of investigating the mechanisms of regulation of histone marks in response to environmental insults. The link between histone modifiers, histone acetylation levels and placental and hepatic function should be established. Alteration of the epigenome early during ontogenesis, could be a mechanism of "memorization" of the environment *in utero*, contributing to particular gene expression patterns and thus to adult phenotype establishment. It could be an underlying mechanism explaining the conditioning of the offspring health later in life (Hanson and Gluckman, 2014; Portha et al., 2014). Advances in this direction should help to unravel the molecular mechanisms of developmental conditioning induced by maternal weight trajectories.

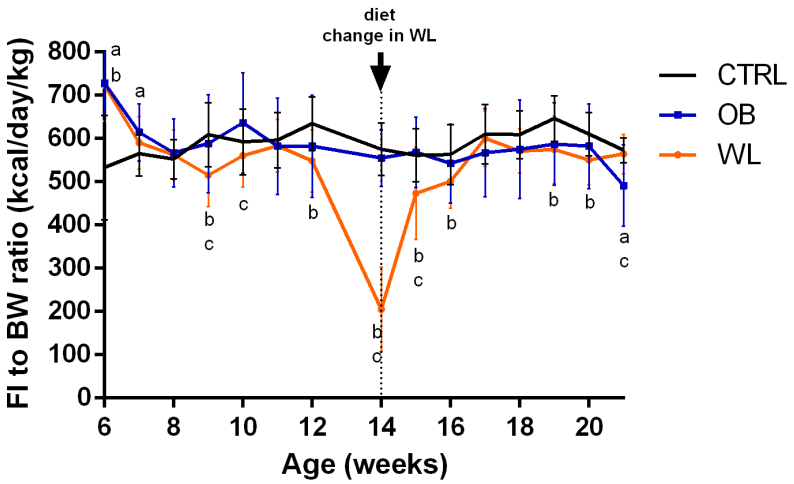
METHODS

Animal experiments

The COMETHEA ethical committee (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale), registered with the national Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale under the n°45, approved this protocol (visa 12/062). Four-week-old female and 7-week-old male C57Bl/6J mice were received from Harlan Laboratory (Venray, Netherlands) and housed in Unité d'Infectologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons (IERP; INRA, Jouy-en-Josas, France). After one week of adaptation, the mice were placed in individual cages at controlled temperature (22 ± 2° C) with a 12 h light /12 h dark cycle. Mice had *ad libitum* access to water and food and paper towel was provided for nest building.

Five-week-old control females (CTRL) were fed a control diet (CD, 10% from fat, 70% from carbohydrates, 20% from protein; #D12450K) and obese females (OB) were fed a high-fat diet (HFD, 59.9% from fat, 20.1% from carbohydrates, 20% from protein; #D12492) during 4 months before conception and throughout gestation (Fig. 1). Diets were purchased in pellet form from Research Diets (New Brunswick, NJ, USA). After two months of HFD (at 14 weeks

Figure S1


diet
change in WL
FI to BW ratio (kcal/day/kg)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
6
8
10
12
14
16
18
20
Age (weeks)
CTRL
OB
WL

of age), a subset of the OB females was placed under CD in order to induce a weight loss (WL group) for the remaining two months before gestation and throughout gestation and lactation. Females and food on the grid were weighted twice a week. Food intake (FI) was calculated as (food day n (g) - food day 0 (g)) / n days, with 3.85 kcal/g for CD and 5.24 kcal/g for HFD. FI to body weight ratio (kcal / kg of body weight / day) was calculated for each mouse. Measurement of fasting cholesterolemia, glycaemia and oral glucose tolerance test (OGTT) were performed at age 13 and 22 weeks (following two and four months feeding).

Females were mated individually with randomly assigned, chow-fed (Special diets services, Witham, Essex, England; #801030 RM3A) 8-9 week-old males (n = 12). The presence of vaginal plug represented embryonic day 0.5 (E0.5). If no plug was observed, females were mated with another male according to their oestrus cycle. All females were mated between 23 and 30 weeks of age. Body weight of pregnant females was recorded at E0.5 and E18.5. Gestational weight gain was calculated as (body weight at E18.5 (g) – body weight at E0.5 (g)) / body weight at E0.5 (g). Pregnant CTRL, OB and WL females were weighed and sacrificed by cervical dislocation at E18.5. Tissue sampling was performed on a table maintained at 4°C. Fetuses and placentas were removed from the uterine corn and placed in a solution of PBS 1X. Maternal carcasses (bodies without the uterus, fetuses and placentas) were weighted and proper maternal body weight gain was calculated as (carcass weight at sacrifice (g) – body weight at E0.5 (g)) / body weight at E0.5 (g). Fetal development stage was in accordance with the "Theiler Staging Criteria for Mouse Embryo Development" (TS 26). Fetal sex was determined by visual examination of the gonads. Fetuses and placentas were weighed (36 CTRL females (F) and 39 CTRL males (M) (14 litters); 35 OB F and 39 OB M (11 litters); 61 WL F and 58 WL M (17 litters)). Maternal group did not alter the sex ratios of the litters (Proportion test: p = 0.81; CTRL - 48% F, 52% M; OB - 47% F, 53% M; WL - 51% F, 49% M). Placental labyrinth and junctional zone were separated and collected, along with fetal liver. Tissue samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C.

Experimental procedures

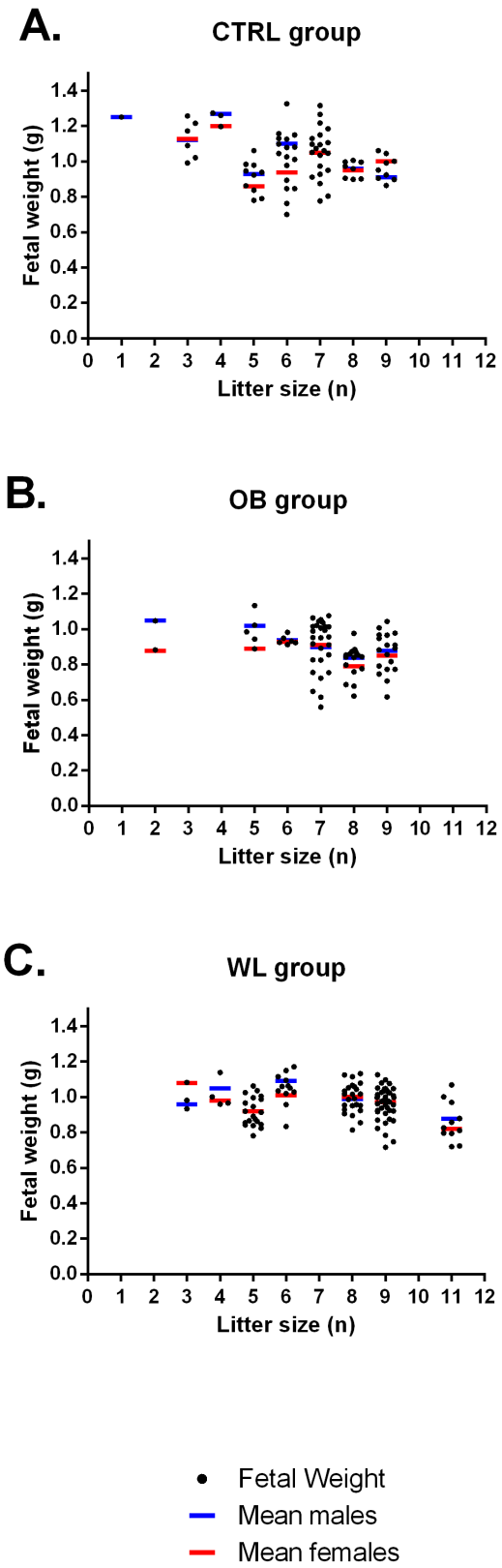
Fasting blood glucose levels were measured in all females (19 CTRL, 23 OB, 19 WL). OGTT were performed in a subset of females under HFD, that showed a maximal body weight and weight gain (n = 11-12 per group) and in CTRL females within an average range of weight. After 6 hours fasting (8:00 am to 2:00 pm), a bolus of glucose (2 g/kg of body weight) was delivered into the stomach of conscious mice with a gavage needle. Tail vein blood glycaemia was measured in duplicate using an Accu-Chek Performa blood glucose meter (Roche diagnostics GmbH, Germany) at time 0, 20, 40, 60, 90 and 120 min. This protocol was described as best discriminating glucose tolerance between HFD *vs* CD mice (Andrikopoulos et al., 2008).

Submandibular vein blood (300 µl) from conscious mice was collected in heparinized tubes (Choay heparin, Sanofi-aventis, Paris, France) after 6 hours fasting. Blood samples were centrifuged for 10 min at 1500 g at 20° C. Plasma was collected and stored at -20° C. Total cholesterol plasma levels were measured by colorimetric dosage on Vitros system in Ambroise Paré Hospital (Boulogne-Billancourt, France).

Statistical analysis of physiological data

We performed complete-case analyses (i.e. we removed all individuals with missing data). Linear mixed models were used to model the evolution of parameters such as weight, food intake and food efficiency with time, using the lmer function of the lme4 package in R (Bates et al., 2014). Estimates of the slopes for each parameter were reported as "β". ANOVA was used to test differences at each time point, thanks to the aov function. Reported p-values were obtained with a likelihood-ratio test, thanks to the lrtest function of the lmtest package (Zeileis

Figure S2.


A.
CTRL group
Fetal weight (g)
Litter size (n)
B.
OB group
Fetal weight (g)
Litter size (n)
C.
WL group
Fetal weight (g)
Litter size (n)
Fetal Weight
Mean males
Mean females

and Hothorn, 2002). All p-values were adjusted for multiple comparisons using the p.adjust function with BH correction (Benjamini and Hochberg, 1995). If significance was found, Tukey's post-hoc test was used to determine which groups differ from one another. Effect size was reported as the proportion R^2 of the variance in the variable of interest (e.g. body weight, cholesterol, fetal weight) that is explained by maternal group, among the variance not already explained by the covariates. For most variables of interest, groups showed unequal variances. Therefore, investigated parameters were Boxcox transformed, using the powerTransform and bcPower functions of the car package (Fox and Sanford, 2011). This function estimates a transformation for the variable z from the family of transformations indexed by the parameter lambda that makes the residuals from the regression of the transformed z on the predictors as closed to normally distributed as possible. We used Pearson's product moment correlation coefficient to test a correlation between fetal weight and placental weight. To adjust for factor "mother", we conducted a regression of fetal weight on mother, and a regression of placental weight on mother. The correlation test was performed on the residuals of both models. We used a proportion test to determine differences in sex ratios in the offspring. We determined a proportion of SGA fetuses as described previously, using Z-score of 1.28 for the calculation of 10^{th} percentile weight (Dilworth et al., 2011). Fisher's exact test was used to compare the proportion of SGA fetuses between maternal groups. Data are represented as Tukey boxplots indicating the median, 25th and 75th percentiles. Whiskers indicate the 5th and 95th percentiles. Outliers are shown as dots.

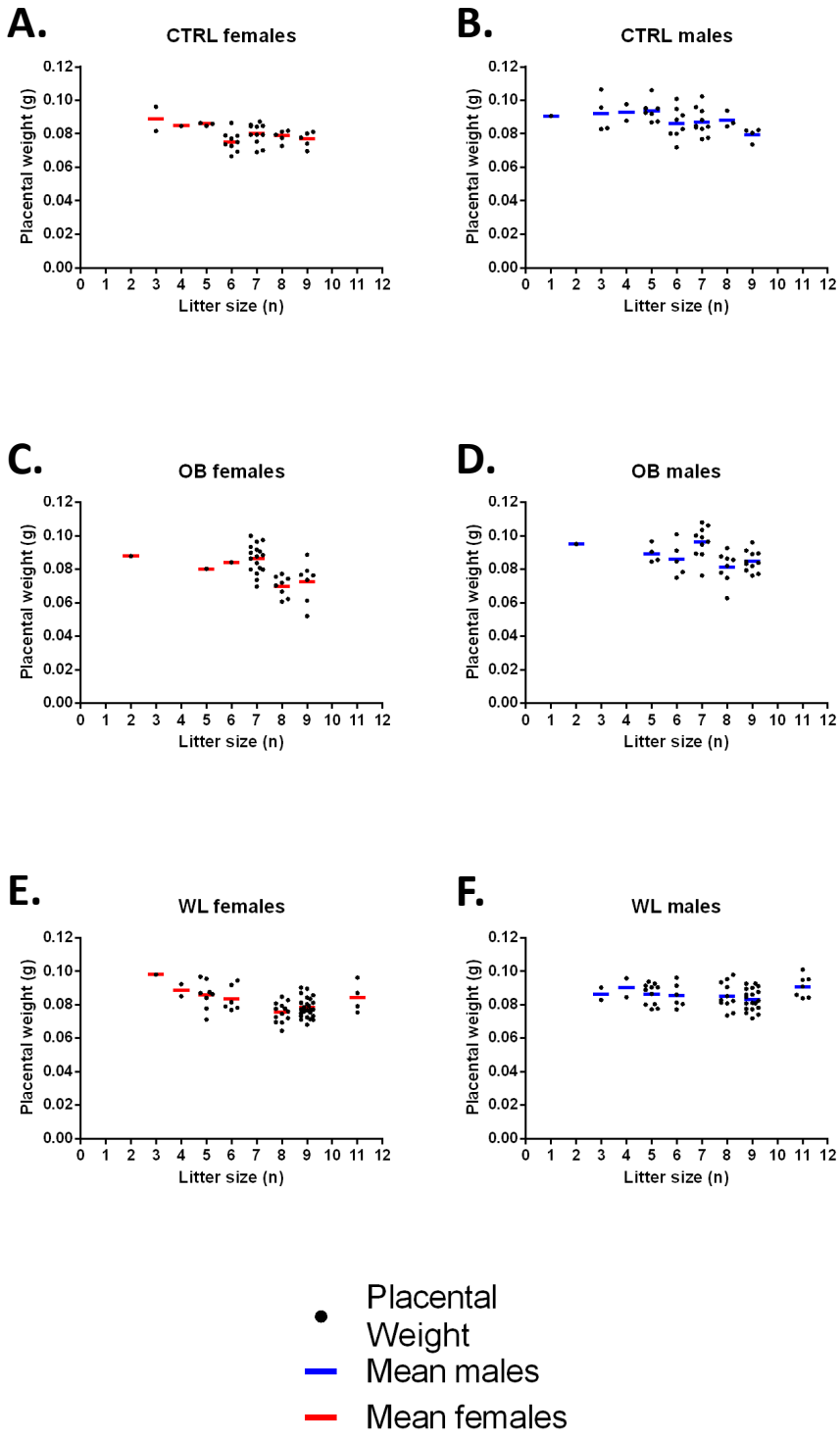
Expression analysis

RNA extraction and DNAse treatment. Only dams with 6-9 fetuses per litter were included in the expression analysis. Total RNA was extracted from 20-50 mg of placental labyrinth, junctional zone or fetal liver; tissue was reduced to a powder in liquid nitrogen and homogenized in 500 µl of TRIZOL reagent in Mixer Mill MM300 (Qiagen) with one tungsten ball for 2 min at 20 Hz twice. Then, RNA was extracted according to the manufacturer's instructions for RNA isolation (Life Technologies). The aqua phase containing RNA was collected using Phase Lock Gel Heavy tubes (5 Prime, Hamburg, Germany). The extracted RNA was resuspended in 100 µl of RNase-free water and stored at -20°C. RNA concentration and purity (A260/A280) were measured using NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and a DNase treatment was performed (DNA-free kit, AM1906, Ambion, Life Technologies). The quality of RNA samples was assessed using Bio-Analyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies). The RNA Integrity Number (RIN) of all samples was between the range of 8.8 and 10.

Reverse-transcription. For each litter, 2.5 µg of RNA per sample was pooled according to sex and maternal diet (n=8 CTRL F, 8 CTRL M, 7 OB F, 7 OB M, 8 WL F, 8 WL M) to obtain a concentration of 40 ng/µl. Six hundred ng of RNA was converted into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations. Samples were assessed in duplicates that were pooled and stored at +4°C.

Quantitative real-time PCR. Gene expression was quantified using custom TaqMan low-density arrays (TLDA) (Applied Biosystems). Each array consisted of a 384-well microfluidic card preloaded with primer sets and 6-FAM-labeled TaqMan probes. The format we chose (96a; Cat. No. 4342261) contained four samples per card; for each sample, the expression of 96 genes was measured, including four control assays. The first set of 60 target genes included genes implicated in epigenetic processes and the second set of 32 target genes included genes implicated in placental / hepatic development or energetic metabolism (Additional file 3). We studied the expression of five DNA methyltransferases (DNMTs), 18 histone deacetylases

Figure S3.


A.
CTRL females
B.
CTRL males
C.
OB females
D.
OB males
E.
WL females
F.
WL males
Placental weight (g)
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
Litter size (n)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Placental Weight
Mean males
Mean females

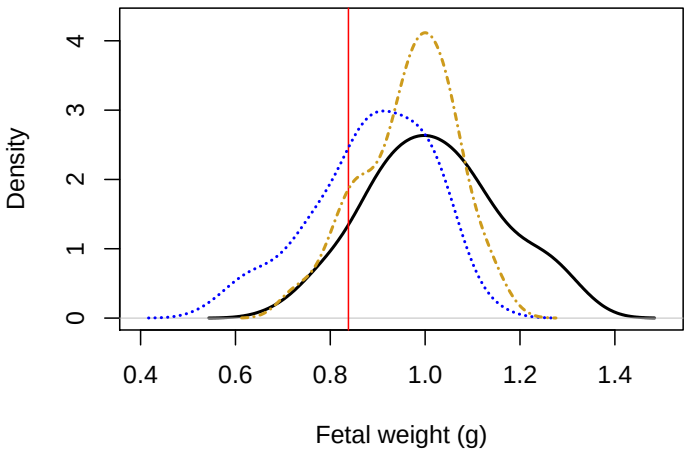
(HDACs), seven lysine methyltransferases (KMTs), seven lysine demethylases (KDMs), nine lysine acetyltransferases (KATs), five Methyl Binding Domain proteins (MBDs), two Bromodomain proteins (BRDs), four arginine transferases (PRMTs) and three enzymes of DNA hydroxymethylation (TETs). All assays and their assay ID numbers are listed in Additional file 2 (Table S1). All probes spanned a gene, an exon–exon junction, except for the following assays: Actb (Mm00607939_s1), Mrpl32 (Mm00777741_sH), Bdnf (Mm04230607_s1), Cebpα (Mm00514283_s1) and Cebpβ (Mm00843434_s1), where primers and probes mapped within a single exon. In addition, the following assays may detect genomic DNA: 18S (Hs99999901_s1), Hdac1 (Mm02391771_g1), Hdac10 (Mm01308118_g1) and Mecp2 (Mm01193537_g1). Thus, all samples were treated with DNase. The experiment was performed on the BRIDGE/ICE platform (INRA, Jouy-en-Josas, France) according to the manufacturer's instructions. Four samples were run on each TLDA card in simplicates. Each sample reservoir on the card was loaded with 100 µl of reaction mix: cDNA template (600 ng) mixed with TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). After centrifugation (twice 1 min at 1200 rpm, Heraeus Multifuge 3S Centrifuge) the wells were sealed with a TLDA Sealer (Applied Biosystems). Real-time PCR amplification was performed on the 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using SDS 2.4 software with standard conditions: 2 min 50°C, 10 min 94.5°C, 30 sec 97°C (40 cycles), 1 min 59.7°C.

Normalization of expression level. Six potential reference genes were tested on fetal liver and placental tissue samples: *Eif4a2* (eukaryotic translation initiation factor 4A2), *ActB* (Actin beta), *Tbp* (TATA box binding protein), *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *Mrpl32* (mitochondrial ribosomal protein L32) and *Sdha* (succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein). Using the GeNorm software, *ActB*, *Sdha* and *Mrpl32* were chosen for normalization of expression levels (Vandesompele et al., 2002). Threshold cycle (Ct) values were calculated with the ExpressionSuite v1.0.3 software (Applied Biosystems). The detection threshold was set manually for all genes and was the same for each assay in all tissues. Ct = 39 was used as the cut-off: above this value, expression level was set to 0. Genes were assigned as non-amplified (NA) if more than 15% of samples were NA. All NA genes (Table S2; 12 in fetal liver, 6 in placental labyrinth and 3 in junctional zone) were removed from the analysis. Normalization was performed independently for same-sex samples within each maternal group (CTRL F, CTRL M, OB F, OB M, WL F, WL M). For each of these groups, $Ct_{[ref]}$ was the mean of the three Ct values of the reference genes. Then, expression level of target genes was calculated as $2^{-(Ct[\text{target gene}] - Ct[ref])}$, as previously described (Gabory et al., 2009).

Hierarchical clustering. For each tissue, transcription values of each target gene were averaged across same-sex samples within each maternal group (CTRL F, CTRL M, OB F, OB M, WL F, WL M). Only genes with expression > 0 were taken into account (80 in liver, 86 in labyrinth and 89 in junctional zone). Then, hierarchical clustering was performed using Pearson correlation coefficient as distance function and Ward as linkage method. Missing Ct-values were imputed, assigning the mean Ct value of the samples with similar sex and maternal diet.

Statistical analysis of TLDA expression study. For each gene, we compared expression values between males and females within each maternal group. As we did not detect an effect of sex on expression for any of the studied genes (except for *Kdm5d* and *Uty*, both located on Y chromosome), we pooled males and females within each maternal group. Pairwise comparisons of maternal groups was conducted using a permutation test, as implemented in the oneway_test function of the *coin* package in R (Zeileis et al., 2008). For each set of tests (i.e. all tested genes for a given pair of maternal groups), p-values were adjusted for multiple testing as proposed by Benjamini and Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995). Differences were considered significant when $P_{adj} < 0.05$. Data are shown as means ± St. Dev or as Tukey boxplots.

Figure S4.



Abbreviations

BRDs: Bromodomain proteins; CD: control diet; CTRL: control group; DNMTs: DNA methyltransferases; DOHaD: developmental origins of health and disease; E18.5: embryonic day 18.5; FGR: fetal growth restriction; FPI: fetal weight-to-placental weight ratio index; H3: histone 3; HDACs: histone deacetylases; HFD: High-fat diet; K9/14/18: lysine 9 / lysine 14 / lysine 18; KATs: lysine acetyltransferases; IUGR: intrauterine growth restriction; KDMs: lysine-specific demethylases; KMTs: lysine methyltransferases; LGA: large for gestational age; MBDs: methyl binding domain proteins; NA: non amplified; OB: obese group; OGTT: oral glucose tolerance test; PRMTs: protein arginine N-methyltransferases; P_{adj}: adjusted p-value; qPCR: real-time polymerase chain reaction; RT: reverse transcription; SGA: small for gestational age; SWI/SNF: SWItch/Sucrose Non-Fermentable, TETs: tet methylcytosine dioxygenases; TLDA: TaqMan low density array; WL: weight loss group

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AG and CJ conceived, designed and supervised the project. PEP, MJ, AP and AG performed the experiments. PEP, SV, LJ and AG performed the analysis of the data. PEP, AG, HJ, SL, CB and CJ and AG analyzed and discussed the data. PEP and AG wrote the draft manuscript. HJ, CB and CJ critically reviewed the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The help of Marion Lemaire with the expression study is greatly acknowledged. We are grateful to Dr Amanda Sferruzzi-Perri for sharing with us her expertise in placental layers sampling. We thank the members of the Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons Unit (UE 0907) of the INRA (Jouy-en-Josas) for their professionalism and help with animal experiments. We thank Bénédicte Langelier (Micalis), Nicolas Crapart and Claudia Bevilacqua (BRIDGE-ICE Platform) of the INRA (Jouy-en-Josas) for technical assistance with TLDA expression study. We wish to thank the members of Neurobiologie de l'Olfaction Unity (UR1197) of INRA for help with tissue sampling. This study was supported by the Fondation Cœur et Artères (FCA 13T1) and Institut Benjamin Delessert. PEP and SV were supported by funding from the Ministère de la Recherche.

The data sets supporting the results of this article are included within the article and its additional files, available at Clin Epigenetic's website.

Author details

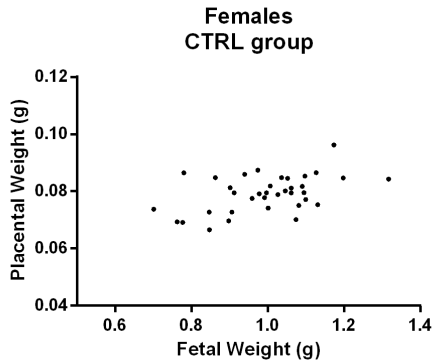
[1] INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy-en-Josas, France

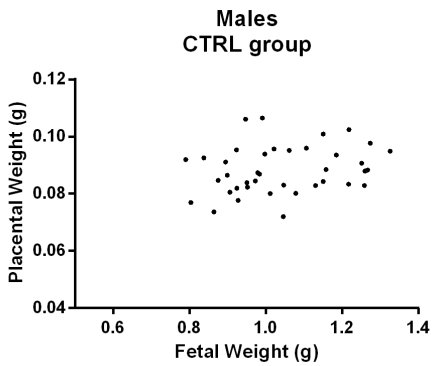
[2] Ecole Doctorale 394 "Physiologie, physiopathologie et thérapeutique", Université Pierre et Marie Curie, 75252 Paris, France

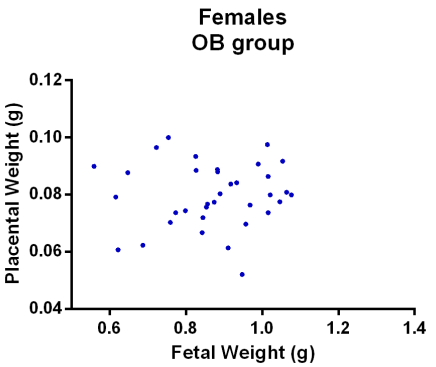
[3] Université Lille, EA4489, Équipe Malnutrition Maternelle et Programmation des Maladies Métaboliques, F59000 Lille, France

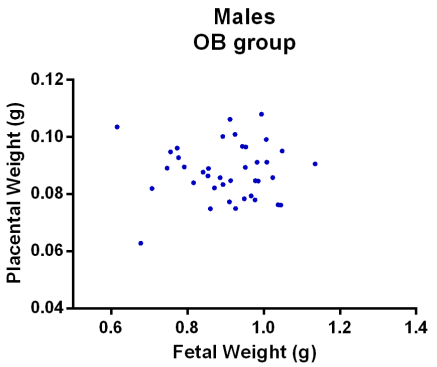
[4] UVSQ, Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Guyancourt, France

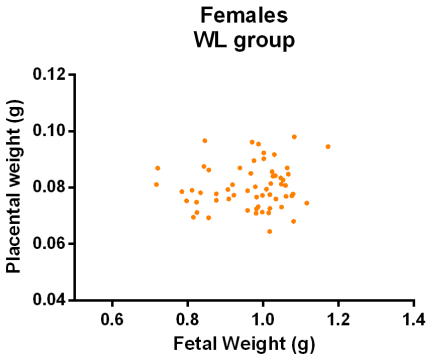
Figure S5.

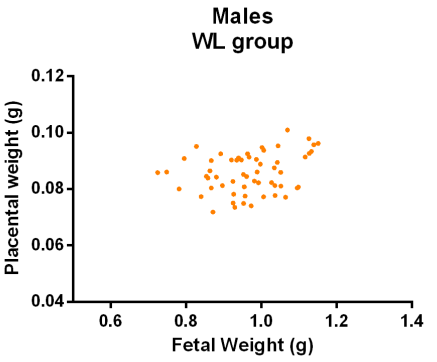

Females
CTRL group
Placental Weight (g)
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
Fetal Weight (g)


Males
CTRL group
Placental Weight (g)
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
Fetal Weight (g)


Females
OB group
Placental Weight (g)
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
Fetal Weight (g)


Males
OB group
Placental Weight (g)
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
Fetal Weight (g)


Females
WL group
Placental weight (g)
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
Fetal Weight (g)


Males
WL group
Placental weight (g)
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
Fetal Weight (g)

ADDITIONAL FILES

Additional file 1 (.pdf)

Figure S1. Food intake (FI) to body weight (BW) ratio in females during the preconceptional period.
(a) *P<0.05* OB *vs.* CTRL, (b) *P<0.05* WL *vs.* CTRL, (c) *P<0.05* WL *vs.* OB. n = 18-20 CTRL, 23 OB, 17-19 WL.

Figure S2. Fetal weight as a function of litter size in dams at E18.5.
Both sexes were combined as there was no effect of sex on fetal weight.

Figure S3. Placental weight as a function of litter size and sex at E18.5.

Figure S4. Distribution of fetal weight in CTRL, OB and WL dams at E18.5.
CTRL dams are represented in black, WL dams in brown and OB dams in blue. The red line represents the 10^{th} percentile of CTRL population.

Figure S5. Relationship between fetal and placental weight in female and male offspring at E18.5.
For statistical analysis see text and materials and methods. M: males, F: females.

Additional file 2 (.xls)

Table S1. List of Taqman gene expression assays.

Additional file 3 (.pdf)

Design of the Custom TaqMan Gene Expression Array Cards

Additional file 4 (.xls)

Table S2. Expression level and adjusted P-values of 92 genes in fetal liver, placental labyrinth and junctional zone.
We assessed the expression level of 60 epigenetic machinery genes and 32 genes implicated in metabolism or development in CTRL, OB and WL females at E18.5 using TaqMan low-density arrays. Data are represented as mean expression levels ± St.Dev. * - differentially expressed genes. NA – non amplified. Significant differences ($P_{adj}<0.05$) are indicated in red.

Gene Symbol	Gene Name	Design Strand	Assay ID
Actb	actin beta	ACTGAGCTGCGTTTTACACCCTTTC	Mm00607939_s1
Mrpl32	mitochondrial ribosomal protein L32	TAGTATCTTTTGGATGGCAGCTCCC	Mm00777741_sH
Sdha	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein	ATTGCTACTGGGGGCTACGGGCGAA	Mm01352366_m1
18S	Eukaryotic 18S rRNA	CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	Hs99999901_s1
Dnmt1	DNA methyltransferase (cytosine-5) 1	CTTCACGAAGGGCCCCACTAAACGG	Mm01151063_m1
Trdmt1	tRNA aspartic acid methyltransferase 1 / Dnmt2	CCAGAATTTGGGTTTCCTGAGAAGA	Mm00438511_m1
Dnmt3a	DNA methyltransferase 3A	ACAGAAGCATATCCAGGAGTGGGGC	Mm00432881_m1
Dnmt3b	DNA methyltransferase 3B	GATTCCTGGCATGTAACCCAGTGAT	Mm01240113_m1
Dnmt3l	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like	TGAAGAGCAAGCATGCGCCCCTGAC	Mm00457635_m1
Brd2	bromodomain containing 2	CTCCCCACAAGCTCCCTGGGGAAGG	Mm00515808_m1
Brd8	bromodomain containing 8	TGGAACAGATCCAGCAATTCTTGGC	Mm00513331_m1
Kat1	K(lysine) acetyltransferase 1 / histone aminotransferase 1 (Hat1)	TTGATATTACAGCGGAAGATCCGTC	Mm00509140_m1
Kat2a	K(lysine) acetyltransferase 2A / Gcn5	TCACTCACTTCCCCAAATTCCTGTC	Mm00517402_m1
Kat3a	K(lysine) acetyltransferase 3A / CREB binding protein (Crebbp) / CBP	CAGGTTTCTCAAGGGATGAATTCAT	Mm01342452_m1
Kat3b	K(lysine) acetyltransferase 3b / E1A binding protein p300 (Ep300)	GCGATGGCACAGATTTTGGTTCACT	Mm00625535_m1
Kat6b	K(lysine) acetyltransferase 6b / MYST histone acetyltransferase monocytic leukemia 4 (Myst4)	GATTGTGGCAGTAGTGGACACCCAT	Mm00450564_m1
Kat13a	K(lysine) acetyltransferase 13a / nuclear receptor coactivator 1 (Ncoa1) / SRC-1	ATGGAAACCAGGACAAGAAGACAGA	Mm01318933_m1
Kat13b	K(lysine) acetyltransferase 13b / nuclear receptor coactivator 3 (Ncoa3) / Src3	GGACCGAGTTCTCTGGGTTTGCGAA	Mm00500775_m1
Kat13c	K(lysine) acetyltransferase 13c / nuclear receptor coactivator 2 (Ncoa2) / SRC-2	AAAGAGGAAGGCGAAGATTTGCAGT	Mm00500749_m1
Kat13d	K(lysine) acetyltransferase 13d / circadian locomotor output cycles kaput (Clock)	GACAGCTGCTGACAAAAGCCAAGAT	Mm00455950_m1
Prmt1	protein arginine N-methyltransferase 1	CTGCATCATGGAGAATTTTGTAGCC	Mm00480133_m1
Prmt2	protein arginine N-methyltransferase 2	GACAGCTATGGAACTCTGAAACTTC	Mm00459994_m1
Prmt5	protein arginine N-methyltransferase 5	CACTTCCTGAAAGATGATGGCGTGA	Mm00550472_m1
Prmt7	protein arginine N-methyltransferase 7	GGAGCTTCAGTGGCGGGACCACTGG	Mm00520495_m1
Tet1	tet methylcytosine dioxygenase 1	TGCTTATCAAAATCAGGTGGAATAT	Mm01169087_m1
Tet2	tet methylcytosine dioxygenase 2	ACAGTGGTGGTCACCCTCAATAGAG	Mm00524395_m1
Tet3	tet methylcytosine dioxygenase 3	TGCACTGTGGTCTGCACCCTGACCA	Mm00805756_m1
Kdm3a	lysine (K)-specific demethylase 3A / JHDM2a / Jmjd1a	CCATGAAGATAAATTGCAGGTGAAA	Mm01182127_m1
Kdm4a	lysine (K)-specific demethylase 4A / JHDM3A / Jmjd2a	CCCAATCTGGAGCGTGCTAAGGGAG	Mm00805000_m1
Kdm5a	lysine (K)-specific demethylase 5A / Jarid1a	GCTTTAAGCAAGATTGTTGCCAGCA	Mm00524457_m1
Kdm5c	lysine (K)-specific demethylase 5C / Jarid1c	ACCACAGCAATGCCCAGTTTATTGA	Mm00840032_m1
Kdm5d	lysine (K)-specific demethylase 5D / Jarid1d	TAAAAGCTAGCCAAAAGCATTCTCC	Mm00803406_m1
Kdm6a	lysine (K)-specific demethylase 6A / Utx	TCCACTCAGGGGCTTCACAAAGGTC	Mm00801998_m1
Uty	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome	GTCCAGTGTCGAAATTCAGTTTCAT	Mm00447710_m1
Kmt1a	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Suv39h1)	TAAAAGGTTGCAGTGTGTGCTGTAA	Mm00468952_m1
Kmt1b	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Suv39h2)	GACTACAAGGTAGCAAAGGGTGTGG	Mm00469689_m1
Kmt1c	euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2 (Ehmt2) / G9a	CTGGGGAGGAGCTGGGCTTTGACTA	Mm01132261_m1
Kmt1d	euchromatic histone methyltransferase 1 (Ehmt1) / GLP1	GTGCAAAATGGTCTCAGGGCAAGGC	Mm00553234_m1
Kmt1e	SET domain, bifurcated 1 (Setdb1)	TTATCCCATTTGCCGACCACTAAAA	Mm00450791_m1
Kmt2c	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3 (Mll3)	GATGAGCAGATTCCCCTTCATGGGC	Mm01156942_m1
Kmt7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7 (Setd7)	AAGCCGTGGAAGGGCACCTGGACGA	Mm00499823_m1
Sirt1	sirtuin 1 (silent mating type information regulation 2)	ACTGGAGCTGGGGTTTCTGTCTCCT	Mm00490758_m1
Sirt2	sirtuin 2 (silent mating type information regulation 2)	AAAAGACAGGCCAGACGGACCCCTT	Mm01149204_m1
Sirt3	sirtuin 3 (silent mating type information regulation 2)	GGCAAGCTGGATGGACAGGACAGAT	Mm00452131_m1
Sirt4	sirtuin 4 (silent mating type information regulation 2 homolog)	GGATGCATGCACAGAGTCCTGTGCC	Mm01201915_m1
Sirt5	sirtuin 5 (silent mating type information regulation 2 homolog)	CAGTCGACAAACTTCCCCGGTGCGA	Mm00663721_m1
Sirt6	sirtuin 6 (silent mating type information regulation 2)	CCCAAGTGTAAGACGCAGTACGTCA	Mm01149042_m1
Sirt7	sirtuin 7 (silent mating type information regulation 2)	TCCTGTCTACAACCGGTGGCAGGAT	Mm01248607_m1
Hdac1	histone deacetylase 1	TGACAAACGCATCTCCATCTGCTCC	Mm02391771_g1
Hdac2	histone deacetylase 2	TTCAGTTGCTGGGGCTGTGAAATTA	Mm00515108_m1
Hdac3	histone deacetylase 3	CCGAGGAGAACTACAGCAGGCCAGA	Mm00515916_m1
Hdac4	histone deacetylase 4	GGACATCCACAGCAAGTACTGGCGC	Mm01299557_m1
Hdac5	histone deacetylase 5	GTCCTCATCGTGGACTGGGATATTC	Mm01246076_m1
Hdac6	histone deacetylase 6	TCTTATTCTAGAGGGTGGATACAAT	Mm01341125_m1
Hdac7	histone deacetylase 7	AGGGTGCACAGGAAATACTGGGGCT	Mm00469527_m1
Hdac8	histone deacetylase 8	CATCAAAGGGAATCTGAAGCATGTG	Mm01224977_m1
Hdac9	histone deacetylase 9	ATCCACATGAACAAACTGCTATCGA	Mm01293999_m1
Hdac10	histone deacetylase 10	ATTGCTGCAGGTGGCTGCTCCTCCA	Mm01308118_g1
Hdac11	histone deacetylase 11	TCCTGAAAGAAGAGAAGCTGCTGTC	Mm01183513_m1
Mecp2	methyl CpG binding protein 2	TTGATCAATCCCCAGGGAAAAGCTT	Mm01193537_g1
Mbd1	methyl-CpG binding domain protein 1	TCTATTACCAGAGCCCCACAGGAGA	Mm00522100_m1
Mbd2	methyl-CpG binding domain protein 2	ACCACGTCAGCTTTTCTGGGAGAAG	Mm00521967_m1
Mbd3	methyl-CpG binding domain protein 3	TGACGACATCAGGAAGCAGGAGGAG	Mm00488961_m1
Mbd5	methyl-CpG binding domain protein 5	AAATGTCTGGGACTGTTCACCAAAT	Mm01272715_m1
Bdnf	brain derived neurotrophic factor	GTGGTCAGTGGCTGGCTCTCTTACC	Mm04230607_s1
Cebpα	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	CTACCAGCCACCGCCGCCACCGCCA	Mm00514283_s1
Cebpβ	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CAAGAAGCCGGCCGACTACGGTTAC	Mm00843434_s1
Gcgr	glucagon receptor	CCACCTACTGAGCTGGTCTGTAACA	Mm00433546_m1
Gck	glucokinase	CAGCAGCTGTACGAAAAGATCATTG	Mm00439129_m1
Gcm1	glial cells missing homolog 1	TTTCCAGTCCAAAGGCGAGCATGAT	Mm00492310_m1
Hsd11β1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	CCTCCTTGGCTGGGAAAATGACCCA	Mm00476182_m1
Hsd11β2	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2	CTCATCACCGGTTGTGACACTGGTT	Mm01251104_m1
Htr2a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	TCCTGTATGGGTACCGGTGGCCTTT	Mm00555764_m1
Htr2c	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C	GCTCACTCCTTGTGCACCTAATTGG	Mm00434127_m1
Igf2	insulin-like growth factor 2	GCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCTTC	Mm00439564_m1
Igf2r	insulin-like growth factor 2 receptor	CTCGTCACTCAGAATCAGAACAGAA	Mm00439576_m1
Insr	insulin receptor / IR	GTACCCTGGAGAGGTGTGCCCTGGT	Mm01211875_m1
Irs1	insulin receptor substrate 1	TCACAGCAGAATGAAGACCTAAATG	Mm01278327_m1
Lep	leptin	TTTCACACACGCAGTCGGTATCCGC	Mm00434759_m1
Lepr	leptin receptor / Leprb / db	GCTGAGGTATCACAGGCGCAGCCTG	Mm00440181_m1
Lpl	lipoprotein lipase	CCATGGATGGACGGTAACGGGAATG	Mm00434764_m1
Maoa	monoamine oxidase A	TGCCTGCCATCATGGGCTTCATACT	Mm00558004_m1
Noct	nocturnin / CCR4 carbon catabolite repression 4-like (Ccrn4l)	CTCGCCCAAGCTCTCGGAGAAGGCA	Mm00802276_m1
Npy	neuropeptide Y	CATCACCAGACAGAGATATGGCAAG	Mm03048253_m1
Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	ACAACACAGGTGGTGTTATCACCTA	Mm00520708_m1
Nr3c1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 / glucocorticoid receptor (GR)	TGGATATTCAAGCCCTGGAATGAGA	Mm00433832_m1
Oxtr	oxytocin receptor	CCAAAGAAGCTTCTGCCTTCATCAT	Mm01182684_m1
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 / PEPCK	CCGTAGACCTGAAGGTGTCCCCCTT	Mm01247058_m1
Pomc	pro-opiomelanocortin-alpha	GAGAGCAACCTGCTGGCTTGCATCC	Mm00435874_m1
Ppargc1α	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha / Pgc-1alpha	TGGAACTGCAGGCCTAACTCCTCCC	Mm01208835_m1
Pparα	peroxisome proliferator activated receptor alpha / Nr1c1	CTGTGGAGATCGGCCTGGCCTTCTA	Mm00440939_m1
Pparγ	peroxisome proliferator activated receptor gamma / Nr1c3	TCACAATGCCATCAGGTTTGGGCGG	Mm01184322_m1
Pparδ	peroxisome proliferator activator receptor delta / Nr1c2	ATGTCGCACAACGCTATCCGCTTTG	Mm00803184_m1
Slc16a10	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 10 / TAT1	TCTTTTGTAAGCTCCATCGAGCCTC	Mm00661045_m1
Slc6a4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 / serotonin transporter (Sert)	CTACCAGAATGGTGGAGGGGCCTTC	Mm00439391_m1
Tph1	tryptophan hydroxylase 1	CCGACCACCCTGGCTTCAAAGACAA	Mm00493794_m1

Table S1.

ADDITIONAL FILE 3

Design of the Custom TaqMan Gene Expression Array Cards

We hypothesized that maternal weight trajectories could alter the expression of epigenetic machinery genes or genes implicated in metabolism or in development. The originality of this study was that different families of epigenetic modifiers were examined. Based on literature and our previous study [1], 60 epigenetic genes were selected because of their implication in metabolic processes, fetal growth, obesity, type-2 diabetes, developmental conditioning of offspring phenotype or the response to maternal nutrition. The second aim of this expression study was to assess the expression of known target genes of developmental conditioning by maternal nutrition (32 genes):

1) DNA methylation

DNA methyltransferases are implicated in developmental programming, fetal growth restriction or the response to maternal HFD [1–6]. We also studied the genes coding for **DNA hydroxymethylation** enzymes (TETs) to see if maternal metabolism could have an impact of their expression. **Methyl-binding domain-containing proteins** play an important role in brain development and in mental disorders, which associate with alterations in feeding behaviour, and also in glucose homeostasis [2,4,7–14].

2) Histone methylation

Some **lysine methyltransferases** are involved in obesity, diabetes, adipogenesis and the response to maternal HFD [1,15–20]. **Lysine demethylases** are also involved in obesity [1,21–23]. **Arginine transferases** are known regulators of glucose metabolism and adipogenesis [24–28].

3) Histone acetylation

Genes related to histone acetylation were particularly suitable to our selection criterion; thus, 29 members of these families were studied out of 60 epigenetic machinery genes. **Histone deacetylases** are involved in adipogenesis, fetal growth restriction and developmental programming by maternal nutrition [5,6,29–32]. **Sirtuins** are largely implicated in lipid and glucose metabolism, and are important sensors of caloric restriction [33–39]. Some sirtuins are associated with an obese phenotype [40–45]. Many members of the **lysine acetyltransferase** family play a role in metabolic diseases like obesity, diabetes and hepatic steatosis [46–55]. **Bromodomain proteins** 2 and 4 are involved in obesity and in adipogenesis [56–58].

4) Glucose and lipid metabolism: *Pparα, Pparγ, Pparδ, Pepck, Pgc-1α, C/Ebp-α, C/Ebp-β, Gck, Lpl, Rev-erbα, Nocturnin, OxtR*

5) Serotonin signaling: *Tph1, Slc6a4, MaoA, 5-HT-r2a, 5-HT-r2c*

6) Glucocorticoid signaling and metabolism: *11βHsd-1, 11βHsd-2, Gr*

7) Appetite regulation: *leptin, leptin receptor, Pomc, Npy, Bdnf*

8) Feto-placental growth: *Gcm1, GcGr, Igf2, Igf2r, Slc16a10, Irs-1, InsR*

For the first three categories, we chose all members of the epigenetic machinery for which we found information related to our selection criterion. Genes for which we did not find relevant

information or that have never been studied in the context of obesity were not taken into account: *Kdm1a*, *Mbd4*, *Brd4*, *Prmt3*, *Prmt4*, *Prmt6*, *Phf8*, *Kdm4b*, *Kdm4c*, *Kdm5b*, *Jarid2*, *Kmt2a*, *Kmt2b*, *Kmt2c*, *Kmt2d*, *Kmt3b*, *Kmt5a*, *Kmt6*.
For a subset of genes in categories 4 to 8, epigenetic alterations are documented in the context of developmental conditioning. For example, methylation and histone modifications in the promoter of the ***glucocorticoid receptor*** are altered in response to maternal nutrition or behaviour [4,59–63]. Methylation of the ***leptin*** promoter and the anorexygenic hypothalamic neuropeptide ***Pomc*** promoter is modified by maternal high-fat or low-protein diet [64–67]. The maternal nutritional environment alters epigenetic marks at the level of transcriptional factors involved in the development of metabolic tissues [60,68–73]. All genes assessed in this study are listed in Additional file 2 with their assay ID numbers (Table S1).

References:

1. Gabory A, Ferry L, Fajardy I, Jouneau L, Gothié J-D, Vigé A, et al. Maternal Diets Trigger Sex-Specific Divergent Trajectories of Gene Expression and Epigenetic Systems in Mouse Placenta. Aguila MB, editor. PLoS ONE. 2012;7:e47986.
2. Ganguly A, Chen Y, Shin B-C, Devaskar SU. Prenatal caloric restriction enhances DNA methylation and MeCP2 recruitment with reduced murine placental glucose transporter isoform 3 expression. J. Nutr. Biochem. 2014;25:259–66.
3. Jensen Peña C, Monk C, Champagne FA. Epigenetic Effects of Prenatal Stress on 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and Fetal Brain. Sun K, editor. PLoS ONE. 2012;7:e39791.
4. Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. Br. J. Nutr. 2007;97:1064.
5. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. J. Clin. Invest. 2008;118:2316–24.
6. Raychaudhuri N, Raychaudhuri S, Thamotharan M, Devaskar SU. Histone Code Modifications Repress Glucose Transporter 4 Expression in the Intrauterine Growth-restricted Offspring. J. Biol. Chem. 2008;283:13611–26.
7. Adegbola AA, Gonzales ML, Chess A, LaSalle JM, Cox GF. A novel hypomorphic MECP2 point mutation is associated with a neuropsychiatric phenotype. Hum. Genet. 2009;124:615–23.
8. Bonnet C, Khan AA, Bresso E, Vigouroux C, Béri M, Lejczak S, et al. Extended spectrum of MBD5 mutations in neurodevelopmental disorders. Eur. J. Hum. Genet. 2013;21:1457–61.
9. Du Y, Liu B, Guo F, Xu G, Ding Y, Liu Y, et al. The Essential Role of Mbd5 in the Regulation of Somatic Growth and Glucose Homeostasis in Mice. Chowen JA, editor. PLoS ONE. 2012;7:e47358.
10. Fyffe SL, Neul JL, Samaco RC, Chao H-T, Ben-Shachar S, Moretti P, et al. Deletion of Mecp2 in Sim1-expressing neurons reveals a critical role for MeCP2 in feeding behavior, aggression, and the response to stress. Neuron. 2008;59:947–58.
11. Hendrich B. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. Genes Dev. 2001;15:710–23.
12. Samaco RC, Fryer JD, Ren J, Fyffe S, Chao H-T, Sun Y, et al. A partial loss of function allele of Methyl-CpG-binding protein 2 predicts a human neurodevelopmental syndrome. Hum. Mol. Genet. 2008;17:1718–27.
13. Sitras V, Paulssen R, Leirvik J, Vartun A, Acharya G. Placental Gene Expression Profile in Intrauterine Growth Restriction Due to Placental Insufficiency. Reprod. Sci. 2009;16:701–11.
14. Zhao X, Ueba T, Christie BR, Barkho B, McConnell MJ, Nakashima K, et al. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. Proc. Natl. Acad. Sci. 2003;100:6777–82.
15. Kleefstra T, Kramer JM, Neveling K, Willemsen MH, Koemans TS, Vissers LELM, et al. Disruption of an EHMT1-Associated Chromatin-Modification Module Causes Intellectual Disability. Am. J. Hum. Genet. 2012;91:73–82.
16. Lohmann F, Loureiro J, Su H, Fang Q, Lei H, Lewis T, et al. KMT1E Mediated H3K9 Methylation is Required for the Maintenance of Embryonic Stem Cells by Repressing Trophectoderm Differentiation. STEM CELLS [Internet]. 2009 [cited 2015 Nov 19]; Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/stem.278
17. Okabe J, Orlowski C, Balcerczyk A, Tikellis C, Thomas MC, Cooper ME, et al. Distinguishing Hyperglycemic Changes by Set7 in Vascular Endothelial Cells. Circ. Res. 2012;110:1067–76.
18. Okamura M, Inagaki T, Tanaka T, Sakai J. Role of histone methylation and demethylation in adipogenesis and obesity. Organogenesis. 2010;6:24–32.
19. Villeneuve LM, Kato M, Reddy MA, Wang M, Lanting L, Natarajan R. Enhanced Levels of microRNA-125b in Vascular Smooth Muscle Cells of Diabetic db/db Mice Lead to Increased Inflammatory Gene Expression by Targeting the Histone Methyltransferase Suv39h1. Diabetes. 2010;59:2904–15.
20. Xin Z, Tachibana M, Guggiari M, Heard E, Shinkai Y, Wagstaff J. Role of Histone Methyltransferase G9a in CpG Methylation of the Prader-Willi Syndrome Imprinting Center. J. Biol. Chem. 2003;278:14996–5000.
21. Gupta J, Kumar S, Li J, Krishna Murthy Karuturi R, Tikoo K. Histone H3 lysine 4 monomethylation (H3K4me1) and H3 lysine 9 monomethylation (H3K9me1): distribution and their association in regulating gene expression under hyperglycaemic/hyperinsulinemic conditions in 3T3 cells. Biochimie. 2012;94:2656–64.

22. Okada Y, Tateishi K, Zhang Y. Histone Demethylase JHDM2A Is Involved in Male Infertility and Obesity. J. Androl. 2010;31:75–8.

23. Tateishi K, Okada Y, Kallin EM, Zhang Y. Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. Nature. 2009;458:757–61.

24. Choi D, Oh K-J, Han H-S, Yoon Y-S, Jung C-Y, Kim S-T, et al. Protein arginine methyltransferase 1 regulates hepatic glucose production in a FoxO1-dependent manner. Hepatology. 2012;56:1546–56.

25. Han H-S, Choi D, Choi S, Koo S-H. Roles of Protein Arginine Methyltransferases in the Control of Glucose Metabolism. Endocrinol. Metab. 2014;29:435.

26. Iwasaki H, Kovacic JC, Olive M, Beers JK, Yoshimoto T, Crook MF, et al. Disruption of Protein Arginine N-Methyltransferase 2 Regulates Leptin Signaling and Produces Leanness In Vivo Through Loss of STAT3 Methylation. Circ. Res. 2010;107:992–1001.

27. LeBlanc SE, Konda S, Wu Q, Hu Y-J, Oslowski CM, Sif S, et al. Protein Arginine Methyltransferase 5 (Prmt5) Promotes Gene Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ2 (PPARγ2) and Its Target Genes during Adipogenesis. Mol. Endocrinol. 2012;26:583–97.

28. Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, et al. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. Mol. Cell. 2008;32:221–31.

29. Aagaard-Tillery KM, Grove K, Bishop J, Ke X, Fu Q, McKnight R, et al. Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. J. Mol. Endocrinol. 2008;41:91–102.

30. Fu Q. Uteroplacental insufficiency induces site-specific changes in histone H3 covalent modifications and affects DNA-histone H3 positioning in day 0 IUGR rat liver. Physiol. Genomics. 2004;20:108–16.

31. Yoo EJ, Chung J-J, Choe SS, Kim KH, Kim JB. Down-regulation of Histone Deacetylases Stimulates Adipocyte Differentiation. J. Biol. Chem. 2006;281:6608–15.

32. Zheng S, Li Q, Zhang Y, Balluff Z, Pan Y-X. Histone deacetylase 3 (HDAC3) participates in the transcriptional repression of the p16INK4a gene in mammary gland of the female rat offspring exposed to an early-life high-fat diet. Epigenetics. 2012;7:183–90.

33. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells. Cell. 2006;126:941–54.

34. Jing E, Gesta S, Kahn CR. SIRT2 Regulates Adipocyte Differentiation through FoxO1 Acetylation/Deacetylation. Cell Metab. 2007;6:105–14.

35. Kanfi Y, Shalman R, Peshti V, Pilosof SN, Gozlan YM, Pearson KJ, et al. Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability. FEBS Lett. 2008;582:543–8.

36. Kim H-S, Xiao C, Wang R-H, Lahusen T, Xu X, Vassilopoulos A, et al. Hepatic-Specific Disruption of SIRT6 in Mice Results in Fatty Liver Formation Due to Enhanced Glycolysis and Triglyceride Synthesis. Cell Metab. 2010;12:224–36.

37. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. Cell Metab. 2009;9:327–38.

38. Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007;104:12861–6.

39. Suter MA, Chen A, Burdine MS, Choudhury M, Harris RA, Lane RH, et al. A maternal high-fat diet modulates fetal SIRT1 histone and protein deacetylase activity in nonhuman primates. FASEB J. 2012;26:5106–14.

40. Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Martínez JA. Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. Eur. J. Clin. Invest. 2008;38:672–8.

41. Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, Grueter CA, Collins AM, Aouizerat B, et al. SIRT3 Deficiency and Mitochondrial Protein Hyperacetylation Accelerate the Development of the Metabolic Syndrome. Mol. Cell. 2011;44:177–90.

42. Nasrin N, Wu X, Fortier E, Feng Y, Bare' OC, Chen S, et al. SIRT4 Regulates Fatty Acid Oxidation and Mitochondrial Gene Expression in Liver and Muscle Cells. J. Biol. Chem. 2010;285:31995–2002.

43. Savastano S, Di Somma C, Colao A, Barrea L, Orio F, Finelli C, et al. Preliminary data on the relationship between circulating levels of Sirtuin 4, anthropometric and metabolic parameters in obese subjects according to growth hormone/insulin-like growth factor-1 status. Growth Horm. IGF Res. 2015;25:28–33.

44. Schwer B, Schumacher B, Lombard DB, Xiao C, Kurtev MV, Gao J, et al. Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. Proc. Natl. Acad. Sci. 2010;107:21790–4.

45. Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, et al. SIRT7 Controls Hepatic Lipid Metabolism by Regulating the Ubiquitin-Proteasome Pathway. Cell Metab. 2014;19:712–21.

46. Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, Girard J, Postic C, Dentin R. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. J. Clin. Invest. 2010;120:4316–31.

47. Coste A, Louet J-F, Lagouge M, Lerin C, Antal MC, Meziane H, et al. The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1α. Proc. Natl. Acad. Sci. 2008;105:17187–92.

48. Garaulet M, Corbalan MD, Madrid JA, Morales E, Baraza JC, Lee Y-C, et al. CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet. Int. J. Obes. 2010;34:516–23.

49. Lerin C, Rodgers JT, Kalume DE, Kim S, Pandey A, Puigserver P. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1α. Cell Metab. 2006;3:429–38.

50. Oishi K, Shirai H, Ishida N. CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. Biochem J. 2005;386:575–81.

51. Picard F, Géhin M, Annicotte J-S, Rocchi S, Champy M-F, O'Malley BW, et al. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. Cell. 2002;111:931–41.

52. Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF, Burgueño A, Castaño G, Pirola CJ. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. Am. J. Clin. Nutr. 2008;87:1606–15.

53. Turek FW. Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. Science. 2005;308:1043–5.

54. Wang Z, Qi C, Krones A, Woodring P, Zhu X, Reddy JK, et al. Critical roles of the p160 transcriptional coactivators p/CIP and SRC-1 in energy balance. Cell Metab. 2006;3:111–22.

55. Zhou XY, Shibusawa N, Naik K, Porras D, Temple K, Ou H, et al. Insulin regulation of hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein. Nat. Med. 2004;10:633–7.

56. Couture J-P, Nolet G, Beaulieu E, Blouin R, Gévry N. The p400/Brd8 chromatin remodeling complex promotes adipogenesis by incorporating histone variant H2A.Z at PPARγ target genes. Endocrinology. 2012;153:5796–808.

57. Denis GV. Bromodomain coactivators in cancer, obesity, type 2 diabetes, and inflammation. Discov. Med. 2010;10:489.

58. Wang F, Liu H, Blanton WP, Belkina A, Lebrasseur NK, Denis GV. *Brd2* disruption in mice causes severe obesity without Type 2 diabetes. Biochem. J. 2010;425:71–83.

59. Begum G, Davies A, Stevens A, Oliver M, Jaquiery A, Challis J, et al. Maternal Undernutrition Programs Tissue-Specific Epigenetic Changes in the Glucocorticoid Receptor in Adult Offspring. Endocrinology. 2013;154:4560–9.

60. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. Br. J. Nutr. 2007;97:435.

61. Conradt E, Lester BM, Appleton AA, Armstrong DA, Marsit CJ. The roles of DNA methylation of *NR3C1* and *11β-HSD2* and exposure to maternal mood disorder in utero on newborn neurobehavior. Epigenetics. 2013;8:1321–9.

62. Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. Epigenetics. 2008;3:97–106.

63. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. Nat. Neurosci. 2004;7:847–54.

64. Jousse C, Parry L, Lambert-Langlais S, Maurin A-C, Averous J, Bruhat A, et al. Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. FASEB J. 2011;25:3271–8.

65. Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome: Nutritionally induced alterations of POMC promoter methylation. J. Physiol. 2009;587:4963–76.

66. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, et al. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. Hum. Mol. Genet. 2009;18:4046–53.

67. Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Yu M, Xu J, Wang Z, et al. Maternal and post-weaning high-fat, high-sucrose diet modulates glucose homeostasis and hypothalamic POMC promoter methylation in mouse offspring. Metab. Brain Dis. [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 10]; Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11011-015-9678-9

68. Borengasser SJ, Zhong Y, Kang P, Lindsey F, Ronis MJJ, Badger TM, et al. Maternal Obesity Enhances White Adipose Tissue Differentiation and Alters Genome-Scale DNA Methylation in Male Rat Offspring. Endocrinology. 2013;154:4113–25.

69. Borengasser SJ, Kang P, Faske J, Gomez-Acevedo H, Blackburn ML, Badger TM, et al. High Fat Diet and In Utero Exposure to Maternal Obesity Disrupts Circadian Rhythm and Leads to Metabolic Programming of Liver in Rat Offspring. Sookoian SC, editor. PLoS ONE. 2014;9:e84209.

70. Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPARα promoter of the offspring. Br. J. Nutr. [Internet]. 2008 [cited 2015 Jun 22];100. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114507894438

71. Pruis MGM, Lendvai á., Bloks VW, Zwier MV, Baller JFW, de Bruin A, et al. Maternal western diet primes non-alcoholic fatty liver disease in adult mouse offspring. Acta Physiol. 2014;210:215–27.

72. Strakovsky RS, Zhang X, Zhou D, Pan Y-X. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats: Programming gluconeogenesis by gestational high fat diet. J. Physiol. 2011;589:2707–17.

73. Zheng S, Rollet M, Pan Y-X. Maternal protein restriction during pregnancy induces CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBPβ) expression through the regulation of histone modification at its promoter region in female offspring rat skeletal muscle. Epigenetics. 2011;6:161–70.

Table S2 A.

Tissue	Gene	Expression level in CTRL	Expression level in OB	Expression level in WL	CTRL *vs.* OB	CTRL *vs.* WL	OB *vs.* WL
Fetal liver	Bdnf	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Brd2*	0.253 ± 0.068	0.341 ± 0.069	0.367 ± 0.103	**0.039**	**0.024**	0.731
	Brd8	1.635 ± 0.611	2.393 ± 0.816	1.942 ± 0.754	0.088	0.572	0.448
	Cebpα	0.138 ± 0.092	0.105 ± 0.064	0.157 ± 0.055	0.637	0.779	0.209
	Cebpβ	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Dnmt1	11.78 ± 5.6	16.73 ± 7.188	14.04 ± 5.035	0.277	0.592	0.592
	Dnmt3a	4.544 ± 1.641	6.31 ± 2.355	5.177 ± 2.235	0.209	0.703	0.513
	Dnmt3b	1.319 ± 0.439	1.474 ± 0.302	1.645 ± 0.762	0.634	0.492	0.745
	Dnmt3l	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Gcgr	0.015 ± 0.008	0.007 ± 0.006	0.008 ± 0.005	0.118	0.153	0.892
	Gck*	0.808 ± 0.562	0.256 ± 0.235	0.76 ± 0.612	**0.031**	0.94	0.088
	Gcm1	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Hdac1	4.155 ± 1.657	3.929 ± 1.283	4.058 ± 1.399	0.932	0.973	0.94
	Hdac10	0.268 ± 0.133	0.178 ± 0.113	0.282 ± 0.142	0.311	0.94	0.209
	Hdac11	0.652 ± 0.284	0.808 ± 0.222	0.732 ± 0.337	0.431	0.764	0.765
	Hdac2*	0.426 ± 0.168	0.202 ± 0.067	0.257 ± 0.132	**0.004**	0.065	0.496
	Hdac3	2.582 ± 1.006	2.601 ± 0.69	2.488 ± 1.175	0.983	0.94	0.94
	Hdac4	0.051 ± 0.015	0.063 ± 0.021	0.049 ± 0.012	0.363	0.934	0.226
	Hdac5	2.634 ± 1.044	2.988 ± 0.795	2.248 ± 0.661	0.651	0.572	0.118
	Hdac6*	1.437 ± 0.425	2.288 ± 0.713	1.777 ± 0.735	**0.012**	0.445	0.339
	Hdac7	0.321 ± 0.168	0.318 ± 0.105	0.327 ± 0.098	0.983	0.973	0.94
	Hdac8	0.151 ± 0.071	0.176 ± 0.066	0.166 ± 0.08	0.663	0.86	0.939
	Hdac9	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Hsd11β1	21.51 ± 11.38	18.1 ± 8.489	20.18 ± 10.25	0.703	0.939	0.839
	Hsd11β2	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Htr2a	0.488 ± 0.263	0.413 ± 0.174	0.419 ± 0.262	0.703	0.752	0.983
	Htr2c	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Igf2	16.96 ± 5.826	16.66 ± 5.215	16.69 ± 4.844	0.973	0.973	0.99
	Igf2r	28.92 ± 16.4	40.89 ± 16.64	30.8 ± 13.45	0.311	0.939	0.357
	Insr	24.08 ± 12.87	27.29 ± 8.577	24.3 ± 9.593	0.745	0.983	0.703
	Irs1	3.998 ± 2.162	4.651 ± 1.862	3.729 ± 1.802	0.703	0.934	0.505
	Kat1	0.02 ± 0.012	0.026 ± 0.009	0.023 ± 0.007	0.496	0.703	0.703
	Kat13a	0.053 ± 0.024	0.054 ± 0.018	0.048 ± 0.017	0.973	0.814	0.703
	Kat13b	0.004 ± 0.004	0.005 ± 0.003	0.008 ± 0.003	0.886	0.153	0.266
	Kat13c	6.786 ± 2.148	8.918 ± 3.066	9.272 ± 4.451	0.226	0.297	0.94
	Kat13d*	2.186 ± 0.594	3.667 ± 0.891	3.16 ± 1.234	**0.0007**	0.307	0.445
	Kat2a*	2.923 ± 0.901	4.767 ± 1.48	4.14 ± 1.508	**0.004**	0.118	0.622
	Kat3a*	0.714 ± 0.185	1.138 ± 0.344	1.039 ± 0.365	**0.008**	0.055	0.745
	Kat3b	0.004 ± 0.004	0.007 ± 0.005	0.007 ± 0.004	0.347	0.277	0.99
	Kat6b*	0.97 ± 0.291	1.647 ± 0.482	1.261 ± 0.406	**0.004**	0.209	0.209
	Kdm3a	4.686 ± 2.402	4.698 ± 1.64	4.366 ± 2.018	0.99	0.932	0.892
	Kdm4a	10.2 ± 5.872	15.97 ± 9.902	12.25 ± 6.548	0.277	0.703	0.592
	Kdm5a	0.416 ± 0.15	0.381 ± 0.121	0.393 ± 0.092	0.779	0.892	0.94
	Kdm5c	32.55 ± 16.52	49.76 ± 20.78	38.51 ± 22.46	0.166	0.731	0.496
	Kdm6a	1.27 ± 0.827	1.176 ± 0.572	1.56 ± 1.016	0.939	0.703	0.572
	Kmt1a	3.352 ± 1.794	4.389 ± 2.108	4.104 ± 2.367	0.494	0.663	0.939
	Kmt1b	0.588 ± 0.295	0.717 ± 0.371	0.551 ± 0.242	0.643	0.934	0.492
	Kmt1c	8.226 ± 3.308	9.634 ± 2.856	9.442 ± 3.79	0.572	0.67	0.973
	Kmt1d	1.332 ± 0.442	1.502 ± 0.518	1.747 ± 0.723	0.94	0.311	0.496
	Kmt1e	1.39 ± 0.628	1.671 ± 0.621	1.416 ± 0.501	0.573	0.973	0.572
	Kmt2c	6.797 ± 3.152	7.701 ± 1.989	8.096 ± 3.538	0.94	0.637	0.737
	Kmt7	10.03 ± 4.882	10.67 ± 4.02	10.54 ± 5.129	0.934	0.94	0.983
	Lep	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Lepr*	0.216 ± 0.088	0.248 ± 0.072	0.173 ± 0.046	0.637	0.377	**0.039**
	Lpl	456.2 ± 202.6	479 ± 205.9	461.3 ± 215.1	0.94	0.983	0.94
	Maoa	0.666 ± 0.334	0.514 ± 0.168	0.628 ± 0.259	0.459	0.939	0.496
	Mbd1	12.96 ± 6.521	17.23 ± 6.168	13.13 ± 6.34	0.357	0.983	0.363
	Mbd2	38.82 ± 20.14	47.53 ± 21.14	37.96 ± 15.35	0.619	0.973	0.496
	Mbd3	37.71 ± 21.04	50.13 ± 19.27	41 ± 22.2	0.427	0.929	0.592
	Mbd5	0.027 ± 0.009	0.034 ± 0.009	0.033 ± 0.016	0.267	0.496	0.973
	Mecp2	0.028 ± 0.011	0.027 ± 0.008	0.035 ± 0.011	0.925	0.363	0.209
	Noct	11.65 ± 7.315	15.86 ± 6.755	11.53 ± 5.923	0.444	0.983	0.347
	Npy	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Nr1d1	0.679 ± 0.497	0.934 ± 0.474	0.627 ± 0.464	0.496	0.94	0.363
	Nr3c1	49.45 ± 28.07	54.43 ± 19.75	51.77 ± 27.38	0.865	0.94	0.94
	Oxtr	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Pck1	6.01 ± 6.933	5.978 ± 6.926	3.746 ± 4.156	0.99	0.645	0.642
	Pomc	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Ppargc1α	1.564 ± 0.708	1.767 ± 0.733	1.684 ± 0.804	0.745	0.917	0.94
	Pparα	84.45 ± 37.77	93.85 ± 32.24	74.84 ± 33.16	0.764	0.745	0.445
	Pparγ	0.246 ± 0.105	0.203 ± 0.072	0.189 ± 0.084	0.558	0.406	0.897
	Pparδ	2.818 ± 1.472	2.885 ± 1.403	2.605 ± 1.471	0.973	0.932	0.873
	Prmt1*	0.495 ± 0.147	0.776 ± 0.206	0.608 ± 0.231	**0.008**	0.431	0.279
	Prmt2	0.282 ± 0.112	0.362 ± 0.095	0.335 ± 0.122	0.279	0.57	0.803
	Prmt5	8.651 ± 4.288	10.92 ± 3.24	9.738 ± 4.857	0.444	0.803	0.745
	Prmt7*	7.103 ± 2.634	11.64 ± 3.854	8.487 ± 2.951	**0.016**	0.496	0.166
	Sirt1	0.236 ± 0.086	0.273 ± 0.104	0.282 ± 0.085	0.641	0.459	0.94
	Sirt2	11.67 ± 5.859	13.62 ± 4.025	13.51 ± 5.919	0.645	0.703	0.983
	Sirt3	12.73 ± 4.651	13.87 ± 5.704	11.81 ± 4.386	0.839	0.854	0.634
	Sirt4	0.175 ± 0.085	0.167 ± 0.048	0.204 ± 0.081	0.94	0.663	0.492
	Sirt5	0.749 ± 0.321	0.775 ± 0.226	0.854 ± 0.281	0.94	0.663	0.729
	Sirt6	0.07 ± 0.041	0.063 ± 0.028	0.083 ± 0.033	0.892	0.869	0.61
	Sirt7	8.767 ± 3.908	8.678 ± 3.607	7.895 ± 3.649	0.983	0.803	0.844
	Slc16a10	2.422 ± 1.481	2.452 ± 1.643	2.391 ± 1.436	0.983	0.983	0.983
	Slc6a4	0.464 ± 0.212	0.389 ± 0.161	0.409 ± 0.179	0.637	0.736	0.94
	Tet1	0.729 ± 0.328	0.99 ± 0.439	0.85 ± 0.477	0.347	0.731	0.731
	Tet2	6.613 ± 2.944	5.91 ± 1.298	6.104 ± 3.239	0.731	0.911	0.973
	Tet3	10.79 ± 4.638	16.34 ± 7.043	12.69 ± 5.993	0.153	0.663	0.459
	Tph1	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Trdmt1	0.732 ± 0.275	0.923 ± 0.274	0.749 ± 0.318	0.344	0.973	0.445

Table S2 B.

Tissue	Gene	Expression level in CTRL	Expression level in OB	Expression level in WL	CTRL *vs.* OB	CTRL *vs.* WL	OB *vs.* WL
Placental Labyrinth	Bdnf	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Brd2*	0.726 ± 0.264	0.912 ± 0.183	1.059 ± 0.306	0.124	**0.036**	0.266
	Brd8	1.274 ± 0.535	1.04 ± 0.316	1.567 ± 0.773	0.312	0.392	0.109
	Cebpα	0.017 ± 0.007	0.021 ± 0.013	0.025 ± 0.012	0.522	0.124	0.56
	Cebpβ	0.016 ± 0.014	0.007 ± 0.008	0.012 ± 0.009	0.216	0.665	0.318
	Dnmt1	4.597 ± 1.821	3.482 ± 1.169	5.205 ± 2.384	0.17	0.606	0.108
	Dnmt3a	13.48 ± 5.469	11.98 ± 6.382	15.12 ± 7.267	0.651	0.633	0.392
	Dnmt3b	0.994 ± 0.384	0.71 ± 0.229	1.115 ± 0.539	0.109	0.633	0.099
	Dnmt3l	3.015 ± 1.376	2.068 ± 0.81	3.287 ± 1.581	0.124	0.747	0.099
	Gcgr	0.065 ± 0.038	0.047 ± 0.023	0.056 ± 0.025	0.254	0.573	0.505
	Gck	0.006 ± 0.005	0.003 ± 0.004	0.004 ± 0.002	0.261	0.402	0.628
	Gcm1	29.71 ± 25.71	15.42 ± 8.191	31.91 ± 26.58	0.153	0.892	0.124
	Hdac1	3.458 ± 1.533	2.858 ± 0.738	3.552 ± 1.218	0.356	0.907	0.189
	Hdac10*	0.216 ± 0.084	0.096 ± 0.047	0.215 ± 0.098	**0.003**	0.978	**0.003**
	Hdac11	0.022 ± 0.008	0.019 ± 0.006	0.023 ± 0.008	0.446	0.862	0.295
	Hdac2*	0.35 ± 0.146	0.231 ± 0.148	0.18 ± 0.083	0.124	**0.014**	0.448
	Hdac3*	4.027 ± 1.405	2.598 ± 0.615	3.808 ± 1.427	**0.021**	0.797	0.053
	Hdac4	0.296 ± 0.12	0.36 ± 0.149	0.311 ± 0.089	0.65	0.811	0.794
	Hdac5	3.837 ± 1.329	2.915 ± 0.951	3.793 ± 1.367	0.13	0.959	0.156
	Hdac6	1.824 ± 0.835	1.799 ± 0.867	2.258 ± 1.142	0.966	0.396	0.396
	Hdac7	0.214 ± 0.095	0.165 ± 0.052	0.234 ± 0.077	0.216	0.92	0.176
	Hdac8	0.042 ± 0.017	0.032 ± 0.011	0.047 ± 0.023	0.182	0.633	0.124
	Hdac9	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Hsd11β1*	49.72 ± 25.53	26.09 ± 13.75	52.14 ± 31.96	**0.046**	0.892	0.065
	Hsd11β2	0.012 ± 0.008	0.014 ± 0.013	0.009 ± 0.004	0.858	0.311	0.313
	Htr2a	0.214 ± 0.145	0.122 ± 0.047	0.196 ± 0.132	0.115	0.838	0.156
	Htr2c	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Igf2	26.67 ± 14.14	24.1 ± 9.175	30.69 ± 7.755	0.742	0.516	0.132
	Igf2r	45.16 ± 19.16	31.59 ± 10.72	52.91 ± 26.71	0.115	0.524	0.073
	Insr	12.03 ± 5.467	7.744 ± 2.347	12.73 ± 7.016	0.078	0.862	0.099
	Irs1*	0.713 ± 0.358	0.384 ± 0.187	0.65 ± 0.405	**0.043**	0.777	0.124
	Kat1*	0.024 ± 0.011	0.041 ± 0.013	0.037 ± 0.01	**0.012**	**0.029**	0.463
	Kat13a	0.059 ± 0.018	0.048 ± 0.014	0.062 ± 0.019	0.192	0.742	0.117
	Kat13b*	0.045 ± 0.022	0.084 ± 0.033	0.087 ± 0.028	**0.017**	**0.003**	0.871
	Kat13c	15.12 ± 6.163	11.64 ± 4.08	19.7 ± 10.77	0.199	0.299	0.078
	Kat13d	3.713 ± 1.47	3.815 ± 1.366	6.01 ± 3.328	0.907	0.103	0.115
	Kat2a	2.033 ± 0.813	1.833 ± 0.647	2.641 ± 1.365	0.633	0.275	0.154
	Kat3a*	1.216 ± 0.42	1.487 ± 0.43	1.843 ± 0.599	0.215	**0.029**	0.192
	Kat3b*	0.012 ± 0.006	0.03 ± 0.014	0.029 ± 0.014	**0.003**	**0.006**	0.907
	Kat6b	1.64 ± 0.607	1.684 ± 0.502	2.134 ± 0.941	0.895	0.206	0.254
	Kdm3a	3.56 ± 1.793	2.216 ± 0.835	3.051 ± 1.445	0.09	0.567	0.179
	Kdm4a	7.793 ± 3.179	6.939 ± 3.172	9.174 ± 6.213	0.633	0.633	0.414
	Kdm5a	1.081 ± 0.329	0.954 ± 0.229	1.175 ± 0.373	0.402	0.633	0.176
	Kdm5c	35.32 ± 19.76	22.86 ± 12.11	37.23 ± 21.48	0.147	0.887	0.124
	Kdm6a	0.886 ± 0.48	0.59 ± 0.202	0.866 ± 0.383	0.13	0.934	0.109
	Kmt1a	2.305 ± 1.722	1.3 ± 0.536	2.545 ± 1.63	0.13	0.813	0.065
	Kmt1b	1.586 ± 0.988	1.595 ± 1.519	1.814 ± 1.029	0.985	0.679	0.807
	Kmt1c	18.15 ± 7.915	12.51 ± 4.575	20.7 ± 10.04	0.115	0.61	0.071
	Kmt1d*	2.09 ± 0.74	1.343 ± 0.37	2.504 ± 1.15	**0.029**	0.402	**0.017**
	Kmt1e	1.145 ± 0.487	0.952 ± 0.321	1.372 ± 0.603	0.392	0.659	0.227
	Kmt2c	17.55 ± 8.376	11.41 ± 4.25	20.12 ± 11.41	0.108	0.633	0.078
	Kmt7	30.97 ± 14.46	22.44 ± 12.73	32.04 ± 18.67	0.224	0.907	0.247
	Lep	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Lepr	50.99 ± 15.08	45.35 ± 16.25	52.5 ± 21	0.507	0.892	0.487
	Lpl	22.82 ± 10.39	16.63 ± 11.53	20.84 ± 11.81	0.269	0.758	0.509
	Maoa	4.408 ± 2.145	2.837 ± 1.137	4.247 ± 1.941	0.109	0.895	0.109
	Mbd1	18.51 ± 10.7	11.8 ± 5.808	19.07 ± 13.29	0.13	0.934	0.179
	Mbd2	38.07 ± 14.42	25.89 ± 9.571	39.57 ± 19.58	0.092	0.89	0.109
	Mbd3	23.23 ± 11.26	14.51 ± 6.032	24.24 ± 14.62	0.101	0.895	0.112
	Mbd5*	0.031 ± 0.01	0.022 ± 0.007	0.035 ± 0.013	0.053	0.48	**0.021**
	Mecp2*	0.035 ± 0.012	0.029 ± 0.01	0.045 ± 0.012	0.247	0.112	**0.007**
	Noct	58.58 ± 32.44	40.64 ± 19.45	55.49 ± 33.52	0.198	0.885	0.304
	Npy	0.009 ± 0.004	0.008 ± 0.004	0.008 ± 0.003	0.449	0.887	0.497
	Nr1d1	0.399 ± 0.214	0.288 ± 0.217	0.352 ± 0.195	0.318	0.669	0.58
	Nr3c1	25.5 ± 12.34	16.13 ± 9.455	27.66 ± 17.98	0.115	0.813	0.13
	Oxtr	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Pck1	0.259 ± 0.219	0.203 ± 0.262	0.197 ± 0.14	0.696	0.524	0.968
	Pomc	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Ppargc1α	0.114 ± 0.056	0.085 ± 0.039	0.113 ± 0.066	0.247	0.98	0.324
	Pparα	0.492 ± 0.295	0.334 ± 0.334	0.456 ± 0.344	0.34	0.862	0.515
	Pparγ	12.97 ± 6.41	8.346 ± 3.843	9.679 ± 4.325	0.109	0.224	0.567
	Pparδ	2.986 ± 1.477	2.024 ± 0.848	2.491 ± 1.045	0.13	0.449	0.349
	Prmt1	0.265 ± 0.105	0.267 ± 0.097	0.354 ± 0.153	0.976	0.176	0.192
	Prmt2	3.044 ± 1.398	2.83 ± 0.847	3.743 ± 1.756	0.776	0.392	0.206
	Prmt5	5.562 ± 2.67	3.619 ± 1.525	6.388 ± 4.284	0.109	0.669	0.115
	Prmt7	3.408 ± 1.599	3.107 ± 1.158	4.509 ± 2.688	0.712	0.318	0.197
	Sirt1	0.513 ± 0.183	0.418 ± 0.125	0.533 ± 0.186	0.24	0.862	0.17
	Sirt2	17.32 ± 6.989	12.94 ± 5.46	18.39 ± 9.125	0.179	0.828	0.172
	Sirt3	2.074 ± 0.807	1.412 ± 0.524	2.306 ± 1.249	0.099	0.685	0.108
	Sirt4*	0.319 ± 0.136	0.23 ± 0.07	0.373 ± 0.158	0.124	0.478	**0.046**
	Sirt5	0.462 ± 0.199	0.321 ± 0.09	0.46 ± 0.196	0.108	0.98	0.109
	Sirt6	0.25 ± 0.113	0.253 ± 0.069	0.31 ± 0.091	0.966	0.238	0.177
	Sirt7	5.281 ± 2.461	3.787 ± 1.571	5.122 ± 2.853	0.172	0.916	0.269
	Slc16a10	2.019 ± 1.02	1.358 ± 0.554	2.203 ± 1.167	0.13	0.776	0.108
	Slc6a4	0.385 ± 0.179	0.223 ± 0.108	0.285 ± 0.156	0.064	0.225	0.396
	Tet1	0.258 ± 0.105	0.185 ± 0.112	0.239 ± 0.145	0.192	0.809	0.446
	Tet2	3.834 ± 1.628	2.393 ± 0.852	3.608 ± 1.985	0.053	0.838	0.131
	Tet3	13.91 ± 6.564	9.437 ± 3.85	15.44 ± 8.593	0.124	0.722	0.109
	Tph1*	0.021 ± 0.01	0.012 ± 0.006	0.021 ± 0.009	**0.033**	0.978	0.05
	Trdmt1	0.385 ± 0.149	0.31 ± 0.118	0.377 ± 0.196	0.275	0.934	0.446

Table S2 C.

Tissue	Gene	Expression level in CTRL	Expression level in OB	Expression level in WL	CTRL *vs.* OB	CTRL *vs.* WL	OB *vs.* WL
Placental Junctional Zone	Bdnf	0.008 ± 0.003	0.007 ± 0.003	0.008 ± 0.002	0.912	0.875	0.694
	Brd2	0.943 ± 0.251	1.038 ± 0.089	1.198 ± 0.273	0.595	0.2	0.277
	Brd8	0.312 ± 0.071	0.366 ± 0.059	0.34 ± 0.054	0.277	0.595	0.595
	Cebpα	0.054 ± 0.015	0.055 ± 0.022	0.065 ± 0.019	0.949	0.512	0.595
	Cebpβ	0.168 ± 0.079	0.118 ± 0.043	0.173 ± 0.055	0.33	0.949	0.171
	Dnmt1	2.584 ± 0.547	2.375 ± 0.432	2.56 ± 0.553	0.607	0.949	0.696
	Dnmt3a	2.395 ± 0.699	2.698 ± 0.612	2.596 ± 0.72	0.595	0.787	0.923
	Dnmt3b	0.107 ± 0.022	0.108 ± 0.019	0.119 ± 0.02	0.949	0.512	0.52
	Dnmt3l	0.07 ± 0.032	0.09 ± 0.053	0.09 ± 0.054	0.595	0.595	0.989
	Gcgr	0.004 ± 0.002	0.005 ± 0.004	0.005 ± 0.003	0.604	0.607	0.949
	Gck	0.001 ± 0.002	8.362e-004 ± 9.108e-004	7.934e-004 ± 5.266e-004	0.607	0.595	0.949
	Gcm1	0.076 ± 0.046	0.138 ± 0.125	0.112 ± 0.078	0.384	0.525	0.834
	Hdac1	2.233 ± 0.397	1.954 ± 0.341	1.801 ± 0.241	0.33	0.066	0.594
	Hdac10	0.091 ± 0.016	0.082 ± 0.016	0.096 ± 0.013	0.512	0.743	0.214
	Hdac11	0.013 ± 0.004	0.015 ± 0.002	0.014 ± 0.006	0.604	0.949	0.923
	Hdac2	0.699 ± 0.134	0.639 ± 0.134	0.595 ± 0.082	0.595	0.217	0.664
	Hdac3	1.171 ± 0.208	1.028 ± 0.131	1.197 ± 0.223	0.277	0.942	0.217
	Hdac4	0.519 ± 0.129	0.482 ± 0.1	0.536 ± 0.086	0.755	0.923	0.52
	Hdac5	0.891 ± 0.305	0.834 ± 0.15	0.9 ± 0.113	0.834	0.949	0.595
	Hdac6	0.696 ± 0.15	0.873 ± 0.233	0.754 ± 0.171	0.217	0.716	0.52
	Hdac7	0.065 ± 0.031	0.047 ± 0.015	0.063 ± 0.013	0.269	0.949	0.171
	Hdac8	0.073 ± 0.028	0.059 ± 0.01	0.07 ± 0.016	0.408	0.949	0.277
	Hdac9	0.002 ± 0.001	0.001 ± 5.458e-004	0.002 ± 5.951e-004	0.217	0.949	0.171
	Hsd11β1	3.629 ± 1.218	3.704 ± 1.162	4.095 ± 1.474	0.949	0.719	0.773
	Hsd11β2	0.017 ± 0.008	0.017 ± 0.007	0.017 ± 0.004	0.949	0.923	0.949
	Htr2a	0.21 ± 0.082	0.255 ± 0.072	0.244 ± 0.047	0.52	0.595	0.875
	Htr2c	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Igf2	12.41 ± 4.124	11.72 ± 2.001	13.1 ± 2.312	0.869	0.869	0.479
	Igf2r	6.221 ± 2.088	6.052 ± 1.584	6.476 ± 1.252	0.949	0.923	0.773
	Insr	2.05 ± 1.047	1.747 ± 0.48	1.985 ± 0.429	0.743	0.949	0.594
	Irs1	0.028 ± 0.009	0.025 ± 0.01	0.027 ± 0.005	0.686	0.923	0.784
	Kat1	0.026 ± 0.006	0.034 ± 0.006	0.034 ± 0.007	0.066	0.073	0.949
	Kat13a	0.014 ± 0.005	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.003	0.595	0.594	0.949
	Kat13b	0.033 ± 0.011	0.035 ± 0.009	0.039 ± 0.006	0.86	0.417	0.595
	Kat13c	1.606 ± 0.607	1.527 ± 0.291	1.619 ± 0.234	0.923	0.967	0.719
	Kat13d	0.951 ± 0.142	1.033 ± 0.095	1.059 ± 0.167	0.417	0.394	0.881
	Kat2a	0.28 ± 0.062	0.288 ± 0.073	0.297 ± 0.065	0.942	0.79	0.927
	Kat3a	0.66 ± 0.132	0.748 ± 0.094	0.861 ± 0.147	0.33	0.064	0.217
	Kat3b*	0.029 ± 0.008	0.042 ± 0.012	0.045 ± 0.012	0.101	**0.04**	0.743
	Kat6b	0.499 ± 0.085	0.564 ± 0.091	0.568 ± 0.094	0.27	0.222	0.949
	Kdm3a	0.784 ± 0.112	0.802 ± 0.139	0.786 ± 0.097	0.923	0.977	0.923
	Kdm4a	1.479 ± 0.581	1.584 ± 0.353	1.551 ± 0.393	0.869	0.923	0.949
	Kdm5a	0.514 ± 0.13	0.594 ± 0.104	0.568 ± 0.045	0.417	0.52	0.756
	Kdm5c	2.321 ± 0.591	2.421 ± 0.642	2.376 ± 0.598	0.73	0.773	0.949
	Kdm6a	0.299 ± 0.123	0.295 ± 0.059	0.308 ± 0.092	0.956	0.949	0.911
	Kmt1a	0.084 ± 0.024	0.096 ± 0.024	0.095 ± 0.02	0.595	0.595	0.949
	Kmt1b	0.508 ± 0.172	0.591 ± 0.179	0.545 ± 0.17	0.595	0.86	0.79
	Kmt1c	3.06 ± 1.029	2.992 ± 0.553	3.285 ± 0.879	0.949	0.834	0.696
	Kmt1d	0.535 ± 0.147	0.5 ± 0.087	0.552 ± 0.078	0.787	0.923	0.479
	Kmt1e	0.201 ± 0.054	0.219 ± 0.055	0.216 ± 0.039	0.743	0.77	0.949
	Kmt2c	3.613 ± 0.915	3.657 ± 0.767	3.662 ± 0.584	0.949	0.949	0.985
	Kmt7	16.34 ± 5.302	14.74 ± 2.843	16.67 ± 3.106	0.716	0.949	0.469
	Lep	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Lepr	1.239 ± 0.456	1.717 ± 0.658	1.518 ± 0.723	0.268	0.595	0.773
	Lpl	1.014 ± 0.282	1.182 ± 0.514	1.151 ± 0.339	0.637	0.595	0.949
	Maoa	0.537 ± 0.133	0.516 ± 0.1	0.511 ± 0.079	0.904	0.834	0.949
	Mbd1	1.847 ± 0.462	1.909 ± 0.348	1.804 ± 0.309	0.923	0.949	0.743
	Mbd2	6.273 ± 1.05	6.047 ± 0.995	6.532 ± 1.24	0.86	0.859	0.607
	Mbd3	2.712 ± 0.531	3.096 ± 0.897	2.919 ± 0.814	0.594	0.79	0.869
	Mbd5	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.002	0.773	0.923	0.595
	Mecp2	0.046 ± 0.011	0.043 ± 0.007	0.052 ± 0.007	0.743	0.439	0.155
	Noct	11.91 ± 2.365	13.82 ± 3.256	12.18 ± 2.473	0.417	0.948	0.525
	Npy	0.021 ± 0.01	0.017 ± 0.008	0.02 ± 0.006	0.52	0.923	0.512
	Nr1d1	0.45 ± 0.141	0.384 ± 0.092	0.49 ± 0.142	0.556	0.773	0.22
	Nr3c1	2.331 ± 0.586	2.303 ± 0.553	2.538 ± 0.387	0.949	0.607	0.595
	Oxtr	0.002 ± 0.001	0.001 ± 5.132e-004	0.002 ± 9.756e-004	0.417	0.982	0.277
	Pck1	0.043 ± 0.06	0.048 ± 0.072	0.024 ± 0.026	0.949	0.64	0.607
	Pomc	**NA**	**NA**	**NA**	-	-	-
	Ppargc1α	0.004 ± 0.002	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.79	0.478	0.595
	Pparα	0.041 ± 0.015	0.04 ± 0.019	0.034 ± 0.011	0.949	0.556	0.637
	Pparγ	1.3 ± 0.363	1.462 ± 0.291	1.19 ± 0.233	0.595	0.696	0.2
	Pparδ	1.612 ± 0.568	1.577 ± 0.442	1.595 ± 0.291	0.949	0.956	0.949
	Prmt1	0.109 ± 0.031	0.097 ± 0.017	0.116 ± 0.022	0.595	0.811	0.217
	Prmt2	1.106 ± 0.427	1.051 ± 0.305	0.996 ± 0.125	0.923	0.756	0.86
	Prmt5	0.545 ± 0.113	0.56 ± 0.091	0.555 ± 0.135	0.923	0.949	0.949
	Prmt7	0.709 ± 0.149	0.7 ± 0.144	0.747 ± 0.127	0.949	0.787	0.719
	Sirt1	0.182 ± 0.056	0.181 ± 0.022	0.202 ± 0.034	0.967	0.595	0.33
	Sirt2	4.509 ± 1.06	4.447 ± 0.534	4.738 ± 0.64	0.949	0.831	0.595
	Sirt3	0.584 ± 0.098	0.597 ± 0.104	0.619 ± 0.08	0.923	0.64	0.834
	Sirt4	0.115 ± 0.046	0.11 ± 0.016	0.123 ± 0.022	0.949	0.881	0.412
	Sirt5	0.103 ± 0.03	0.1 ± 0.016	0.105 ± 0.018	0.949	0.949	0.787
	Sirt6	0.274 ± 0.076	0.275 ± 0.041	0.359 ± 0.115	0.982	0.217	0.171
	Sirt7	1.79 ± 0.556	1.696 ± 0.221	1.653 ± 0.224	0.869	0.756	0.875
	Slc16a10	0.484 ± 0.179	0.457 ± 0.131	0.56 ± 0.134	0.923	0.595	0.33
	Slc6a4	0.511 ± 0.181	0.426 ± 0.115	0.447 ± 0.099	0.545	0.595	0.875
	Tet1	0.007 ± 0.002	0.01 ± 0.003	0.009 ± 0.003	0.203	0.556	0.683
	Tet2	0.617 ± 0.092	0.533 ± 0.09	0.568 ± 0.063	0.22	0.479	0.595
	Tet3	1.807 ± 0.433	2.113 ± 0.41	1.948 ± 0.519	0.384	0.773	0.719
	Tph1	0.036 ± 0.011	0.024 ± 0.01	0.033 ± 0.007	0.171	0.73	0.20
	Trdmt1	0.161 ± 0.04	0.168 ± 0.034	0.142 ± 0.027	0.872	0.533	0.247

REFERENCES

Aagaard-Tillery, K. M., Grove, K., Bishop, J., Ke, X., Fu, Q., McKnight, R. and Lane, R. H. (2008). Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. J. Mol. Endocrinol. 41, 91–102.

Acosta, O., Ramirez, V. I., Lager, S., Gaccioli, F., Dudley, D. J., Powell, T. L. and Jansson, T. (2015). Increased glucose and placental GLUT-1 in large infants of obese nondiabetic mothers. Am. J. Obstet. Gynecol. 212, 227.e1–227.e7.

Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C. and Proietto, J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. AJP Endocrinol. Metab. 295, E1323–E1332.

Attig, L., Gabory, A. and Junien, C. (2010). Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows: Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 13, 284–293.

Attig, L., Vigé, A., Gabory, A., Karimi, M., Beauger, A., Gross, M.-S., Athias, A., Gallou-Kabani, C., Gambert, P., Ekstrom, T. J., et al. (2013). Dietary alleviation of maternal obesity and diabetes: increased resistance to diet-induced obesity transcriptional and epigenetic signatures. PloS One 8, e66816.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. and Walker, S. (2014). Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. arXiv:1406.5823.

Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol. 57, 289–300.

Bogaerts, A., Ameye, L., Martens, E. and Devlieger, R. (2015). Weight loss in obese pregnant women and risk for adverse perinatal outcomes. Obstet. Gynecol. 125, 566–575.

Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M. L., King, J., Shih, J. C., Blakely, R. D., Deneris, E. S. and Levitt, P. (2011). A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. Nature 472, 347–350.

Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F., Girard, J., Postic, C. and Dentin, R. (2010). Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. J. Clin. Invest. 120, 4316–4331.

Clifton, V. L. (2010). Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival. Placenta 31, S33–S39.

Colomiere, M., Permezel, M., Riley, C., Desoye, G. and Lappas, M. (2009). Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. Eur. J. Endocrinol. 160, 567–578.

Coste, A., Louet, J.-F., Lagouge, M., Lerin, C., Antal, M. C., Meziane, H., Schoonjans, K., Puigserver, P., O'Malley, B. W. and Auwerx, J. (2008). The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1α. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 17187–17192.

Delahaye, F., Wijetunga, N. A., Heo, H. J., Tozour, J. N., Zhao, Y. M., Greally, J. M. and Einstein, F. H. (2014). Sexual dimorphism in epigenomic responses of stem cells to extreme fetal growth. Nat. Commun. 5, 5187.

Dilworth, M. R., Kusinski, L. C., Baker, B. C., Renshall, L. J., Greenwood, S. L., Sibley, C. P. and Wareing, M. (2011). Defining fetal growth restriction in mice: A standardized and clinically relevant approach. Placenta 32, 914–916.

Ding, L., Pan, R., Huang, X., Wang, J.-X., Shen, Y.-T., Xu, L., Zhang, Y., Liu, Y., He, X.-Q., Yang, X.-J., et al. (2012). Changes in histone acetylation during oocyte meiotic maturation in the diabetic mouse. Theriogenology 78, 784–792.

Diouf, I., Charles, M. A., Thiebaugeorges, O., Forhan, A., Kaminski, M., Heude, B. and EDEN Mother–Child Cohort Study Group (2011). Maternal weight change before pregnancy in relation to birthweight and risks of adverse pregnancy outcomes. Eur. J. Epidemiol. 26, 789–796.

Donohoe, D. R. and Bultman, S. J. (2012). Metaboloepigenetics: Interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. J. Cell. Physiol. 227, 3169–3177.

Du, Y., Liu, B., Guo, F., Xu, G., Ding, Y., Liu, Y., Sun, X. and Xu, G. (2012). The Essential Role of Mbd5 in the Regulation of Somatic Growth and Glucose Homeostasis in Mice. PLoS ONE 7, e47358.

Dube, E., Gravel, A., Martin, C., Desparois, G., Moussa, I., Ethier-Chiasson, M., Forest, J.-C., Giguere, Y., Masse, A. and Lafond, J. (2012). Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta. Biol. Reprod. 87, 14–14.

Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S. E., Alenghat, T., Liu, X. S. and Lazar, M. A. (2011). A Circadian Rhythm Orchestrated by Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. Science 331, 1315–1319.

Fernandez-Twinn, D. S. and Ozanne, S. E. (2006). Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. Physiol. Behav. 88, 234–243.

Forsum, E., Brantsæter, A. L., Olafsdottir, A.-S., Olsen, S. F. and Thorsdottir, I. (2013). Weight loss before conception: A systematic literature review. Food Nutr. Res. 57,.

Fox, J. and Sanford, W. (2011). An {R} Companion to Applied Regression. second. Thousand Oaks {CA}: Sage.

Fu, Q. (2004). Uteroplacental insufficiency induces site-specific changes in histone H3 covalent modifications and affects DNA-histone H3 positioning in day 0 IUGR rat liver. Physiol. Genomics 20, 108–116.

Fyffe, S. L., Neul, J. L., Samaco, R. C., Chao, H.-T., Ben-Shachar, S., Moretti, P., McGill, B. E., Goulding, E. H., Sullivan, E., Tecott, L. H., et al. (2008). Deletion of Mecp2 in Sim1-expressing neurons reveals a critical role for MeCP2 in feeding behavior, aggression, and the response to stress. Neuron 59, 947–958.

Gabory, A., Ripoche, M.-A., Le Digarcher, A., Watrin, F., Ziyyat, A., Forné, T., Jammes, H., Ainscough, J. F. X., Surani, M. A., Journot, L., et al. (2009). H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. Dev. Camb. Engl. 136, 3413–3421.

Gabory, A., Attig, L. and Junien, C. (2011). Developmental programming and epigenetics. Am. J. Clin. Nutr. 94, 1943S–1952S.

Gabory, A., Ferry, L., Fajardy, I., Jouneau, L., Gothié, J.-D., Vigé, A., Fleur, C., Mayeur, S., Gallou-Kabani, C., Gross, M.-S., et al. (2012). Maternal Diets Trigger Sex-Specific Divergent Trajectories of Gene Expression and Epigenetic Systems in Mouse Placenta. PLoS ONE 7, e47986.

Ganguly, A., Chen, Y., Shin, B.-C. and Devaskar, S. U. (2014). Prenatal caloric restriction enhances DNA methylation and MeCP2 recruitment with reduced murine placental glucose transporter isoform 3 expression. J. Nutr. Biochem. 25, 259–266.

Garaulet, M., Corbalan, M. D., Madrid, J. A., Morales, E., Baraza, J. C., Lee, Y.-C. and Ordovas, J. M. (2010). CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet. Int. J. Obes. 34, 516–523.

Gaudet, L., Ferraro, Z. M., Wen, S. W. and Walker, M. (2014). Maternal Obesity and Occurrence of Fetal Macrosomia: A Systematic Review and Meta-Analysis. BioMed Res. Int. 2014, 1–22.

Ge, Z.-J., Luo, S.-M., Lin, F., Liang, Q.-X., Huang, L., Wei, Y.-C., Hou, Y., Han, Z.-M., Schatten, H. and Sun, Q.-Y. (2013). DNA Methylation in Oocytes and Liver of Female Mice and Their Offspring: Effects of High-Fat-Diet–Induced Obesity. Environ. Health Perspect.

Georgiades, P., Ferguson-Smith, A. C. and Burton, G. J. (2002). Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. Placenta 23, 3–19.

Gheorghe, C. P., Goyal, R., Mittal, A. and Longo, L. D. (2010). Gene expression in the placenta: maternal stress and epigenetic responses. Int. J. Dev. Biol. 54, 507–523.

Goeden, N., Velasquez, J. C. and Bonnin, A. (2013). Placental tryptophan metabolism as a potential novel pathway for the developmental origins of mental diseases. Transl. Dev. Psychiatry 1: 20593.

Hales, C. N., Barker, D. J., Clark, P. M., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C. and Winter, P. D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. BMJ 303, 1019–1022.

Han, H.-S., Choi, D., Choi, S. and Koo, S.-H. (2014). Roles of Protein Arginine Methyltransferases in the Control of Glucose Metabolism. Endocrinol. Metab. 29, 435.

Hanson, M. A. and Gluckman, P. D. (2014). Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? Physiol. Rev. 94, 1027–1076.

Hayes, E. K., Lechowicz, A., Petrik, J. J., Storozhuk, Y., Paez-Parent, S., Dai, Q., Samjoo, I. A., Mansell, M., Gruslin, A., Holloway, A. C., et al. (2012). Adverse Fetal and Neonatal Outcomes Associated with a Life-Long High Fat Diet: Role of Altered Development of the Placental Vasculature. PLoS ONE 7, e33370.

Hiden, U., Glitzner, E., Hartmann, M. and Desoye, G. (2009). Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. J. Anat. 215, 60–68.

Jones, H. N., Woollett, L. A., Barbour, N., Prasad, P. D., Powell, T. L. and 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. 23, 271–278.

King, V., Hibbert, N., Seckl, J. R., Norman, J. E. and Drake, A. J. (2013). The effects of an obesogenic diet during pregnancy on fetal growth and placental gene expression are gestation dependent. Placenta 34, 1087–1090.

Lane, R. H., MacLennan, N. K., Hsu, J. L., Janke, S. M. and Pham, T. D. (2002). Increased hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1 gene expression in a rat model of intrauterine growth retardation and subsequent insulin resistance. Endocrinology 143, 2486–2490.

Lee, C. Y. W. and Koren, G. (2010). Maternal obesity: Effects on pregnancy and the role of pre-conception counselling. J. Obstet. Gynaecol. 30, 101–106.

Li, J., Wang, W., Liu, C., Wang, W., Li, W., Shu, Q., Chen, Z.-J. and Sun, K. (2013). Critical Role of Histone Acetylation by p300 in Human Placental 11β-HSD2 Expression. J. Clin. Endocrinol. Metab. 98, E1189–E1197.

Liu, L., Hong, Z. and Zhang, L. (2015). Associations of prepregnancy body mass index and gestational weight gain with pregnancy outcomes in nulliparous women delivering single live babies. Sci. Rep. 5, 12863.

Luzzo, K. M., Wang, Q., Purcell, S. H., Chi, M., Jimenez, P. T., Grindler, N., Schedl, T. and Moley, K. H. (2012). High Fat Diet Induced Developmental Defects in the Mouse: Oocyte Meiotic Aneuploidy and Fetal Growth Retardation/Brain Defects. PLoS ONE 7, e49217.

MacLennan, N. K. (2004). Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. Physiol. Genomics 18, 43–50.

Mao, J., Zhang, X., Sieli, P. T., Falduto, M. T., Torres, K. E. and Rosenfeld, C. S. (2010). Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 5557–5562.

Marmorstein, R. and Zhou, M.-M. (2014). Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6, a018762–a018762.

Martinez, J. A., Milagro, F. I., Claycombe, K. J. and Schalinske, K. L. (2014). Epigenetics in Adipose Tissue, Obesity, Weight Loss, and Diabetes. Adv. Nutr. Int. Rev. J. 5, 71–81.

McCurdy, C. E., Bishop, J. M., Williams, S. M., Grayson, B. E., Smith, M. S., Friedman, J. E. and Grove, K. L. (2009). Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. J. Clin. Invest.

Mele, J., Muralimanoharan, S., Maloyan, A. and Myatt, L. (2014). Impaired mitochondrial function in human placenta with increased maternal adiposity. AJP Endocrinol. Metab. 307, E419–E425.

Muramatsu-Kato, K., Itoh, H., Kobayashi-Kohmura, Y., Murakami, H., Uchida, T., Suzuki, K., Sugihara, K., Kanayama, N., Tsuchiya, K. J., Takei, N., et al. (2014). Comparison between placental gene expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenases and infantile growth at 10 months of age: Placental 11βHSD and infantile growth. J. Obstet. Gynaecol. Res. 40, 465–472.

Ng, M. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet 766–81.

Nicholas, L. M., Rattanatray, L., MacLaughlin, S. M., Ozanne, S. E., Kleemann, D. O., Walker, S. K., Morrison, J. L., Zhang, S., Muhlhausler, B. S., Martin-Gronert, M. S., et al. (2013). Differential effects of maternal obesity and weight loss in the periconceptional period on the epigenetic regulation of hepatic insulin-signaling pathways in the offspring. FASEB J. 27, 3786–3796.

Paden, M. M. and Avery, D. M. (2012). Preconception counseling to prevent the complications of obesity during pregnancy. Am J Clin Med 9, 30–35.

Park, J. H., Stoffers, D. A., Nicholls, R. D. and Simmons, R. A. (2008). Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. J. Clin. Invest. 118, 2316–2324.

Plata, M. del M., Williams, L., Seki, Y., Hartil, K., Kaur, H., Lin, C.-L., Fiallo, A., Glenn, A. S., Katz, E. B., Fuloria, M., et al. (2014). Critical periods of increased fetal vulnerability to a maternal high fat diet. Reprod. Biol. Endocrinol. RBE 12, 80.

Portha, B., Fournier, A., Ah Kioon, M. D., Mezger, V. and Movassat, J. (2014). Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. Biochimie 97, 1–15.

Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K. D., Lindner, J., Cherrington, A. D. and Magnuson, M. A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. J. Biol. Chem. 274, 305–315.

Rajasingam, D., Seed, P. T., Briley, A. L., Shennan, A. H. and Poston, L. (2009). A prospective study of pregnancy outcome and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women. Am. J. Obstet. Gynecol. 200, 395.e1–395.e9.

Raychaudhuri, N., Raychaudhuri, S., Thamotharan, M. and Devaskar, S. U. (2008). Histone Code Modifications Repress Glucose Transporter 4 Expression in the Intrauterine Growth-restricted Offspring. J. Biol. Chem. 283, 13611–13626.

Robker, R. L., Akison, L. K., Bennett, B. D., Thrupp, P. N., Chura, L. R., Russell, D. L., Lane, M. and Norman, R. J. (2009). Obese Women Exhibit Differences in Ovarian Metabolites, Hormones, and Gene Expression Compared with Moderate-Weight Women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 94, 1533–1540.

Rosario, F. J., Kanai, Y., Powell, T. L. and Jansson, T. (2015). Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth: Maternal Obesity and Placental Nutrient Transport. Obesity 23, 1663–1670.

Sasson, I. E., Vitins, A. P., Mainigi, M. A., Moley, K. H. and Simmons, R. A. (2015). Pre-gestational vs gestational exposure to maternal obesity differentially programs the offspring in mice. Diabetologia 58, 615–624.

Sferruzzi-Perri, A. N., Vaughan, O. R., Haro, M., Cooper, W. N., Musial, B., Charalambous, M., Pestana, D., Ayyar, S., Ferguson-Smith, A. C., Burton, G. J., et al. (2013). An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory. FASEB J. 27, 3928–3937.

Sookoian, S., Gemma, C., Gianotti, T. F., Burgueño, A., Castaño, G. and Pirola, C. J. (2008). Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. Am. J. Clin. Nutr. 87, 1606–1615.

Srinivasan, M. (2005). Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. AJP Endocrinol. Metab. 290, E129–E134.

Strakovsky, R. S., Zhang, X., Zhou, D. and Pan, Y.-X. (2011). Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats: Programming gluconeogenesis by gestational high fat diet. J. Physiol. 589, 2707–2717.

Street, M. E., Viani, I., Ziveri, M. A., Volta, C., Smerieri, A. and Bernasconi, S. (2011). Impairment of insulin receptor signal transduction in placentas of intra-uterine growth-restricted newborns and its relationship with fetal growth. Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc. 164, 45–52.

Struwe, E., Berzl, G. M., Schild, R. L., Beckmann, M. W., Dörr, H. G., Rascher, W. and Dötsch, J. (2007). Simultaneously reduced gene expression of cortisol-activating and cortisol-inactivating enzymes in placentas of small-for-gestational-age neonates. Am. J. Obstet. Gynecol. 197, 43.e1–43.e6.

Suter, M. A., Chen, A., Burdine, M. S., Choudhury, M., Harris, R. A., Lane, R. H., Friedman, J. E., Grove, K. L., Tackett, A. J. and Aagaard, K. M. (2012). A maternal high-fat diet modulates fetal SIRT1 histone and protein deacetylase activity in nonhuman primates. FASEB J. 26, 5106–5114.

Suter, M. A., Ma, J., Vuguin, P. M., Hartil, K., Fiallo, A., Harris, R. A., Charron, M. J. and Aagaard, K. M. (2014). In utero exposure to a maternal high-fat diet alters the epigenetic histone code in a murine model. Am. J. Obstet. Gynecol. 210, 463.e1–463.e11.

Swanson, A. M. and David, A. L. (2015). Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine. Placenta 36, 623–630.

Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D., Aubrière, M.-C., Peynot, N., Dahirel, M., Bertrand-Michel, J., Aguirre-Lavin, T., Morel, O., Beaujean, N., Duranthon, V., et al. (2013). Sexual Dimorphism of the Feto-Placental Phenotype in Response to a High Fat and Control Maternal Diets in a Rabbit Model. PLoS ONE 8, e83458.

Tuersunjiang, N., Odhiambo, J. F., Long, N. M., Shasa, D. R., Nathanielsz, P. W. and Ford, S. P. (2013). Diet reduction to requirements in obese/overfed ewes from early gestation prevents glucose/insulin dysregulation and returns fetal adiposity and organ development to control levels. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 305, E868–878.

Turek, F. W. (2005). Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. Science 308, 1043–1045.

Vaiman, D., Gascoin-Lachambre, G., Boubred, F., Mondon, F., Feuerstein, J.-M., Ligi, I., Grandvuillemin, I., Barbaux, S., Ghigo, E., Achard, V., et al. (2011). The Intensity of IUGR-Induced Transcriptome Deregulations Is Inversely Correlated with the Onset of Organ Function in a Rat Model. PLoS ONE 6, e21222.

Vaiman, D., Calicchio, R. and Miralles, F. (2013). Landscape of Transcriptional Deregulations in the Preeclamptic Placenta. PLoS ONE 8(6): e65498.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 3, research0034.

Villamor, E. and Cnattingius, S. (2006). Interpregnancy weight change and risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study. The Lancet 368, 1164–1170.

Wang, F., Liu, H., Blanton, W. P., Belkina, A., Lebrasseur, N. K. and Denis, G. V. (2010). Brd2 disruption in mice causes severe obesity without Type 2 diabetes. Biochem. J. 425, 71–83.

Wang, X., Lacza, Z., Sun, Y. E. and Han, W. (2014). Leptin resistance and obesity in mice with deletion of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) in hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) neurons. Diabetologia 57, 236–245.

Waterland, R. A. and Michels, K. B. (2007). Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis. Annu. Rev. Nutr. 27, 363–388.

Wei, Y., Yang, C.-R., Wei, Y.-P., Ge, Z.-J., Zhao, Z.-A., Zhang, B., Hou, Y., Schatten, H. and Sun, Q.-Y. (2015). Enriched Environment-induced Maternal Weight Loss Reprograms Metabolic Gene Expression in Mouse Offspring. J. Biol. Chem. 290, 4604–4619.

Wu, L. L.-Y., Dunning, K. R., Yang, X., Russell, D. L., Lane, M., Norman, R. J. and Robker, R. L. (2010). High-Fat Diet Causes Lipotoxicity Responses in Cumulus–Oocyte Complexes and Decreased Fertilization Rates. Endocrinology 151, 5438–5445.

Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y. and Fukamizu, A. (2008). Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. Mol. Cell 32, 221–231.

Yoo, E. J., Chung, J.-J., Choe, S. S., Kim, K. H. and Kim, J. B. (2006). Down-regulation of Histone Deacetylases Stimulates Adipocyte Differentiation. J. Biol. Chem. 281, 6608–6615.

Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P. M., Rodríguez-González, G. L. and Nathanielsz, P. W. (2010). RAPID REPORT: Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats: Dietary intervention to reverse metabolic programming outcomes. J. Physiol. 588, 1791–1799.

Zeileis, A. and Hothorn, T. (2002). Diagnostic Checking in Regression Relationships. R News 2, 7–10.

Zeileis, A., Wiel, M. A., Hornik, K. and Hothorn, T. (2008). Implementing a class of permutation tests: The coin package. J. Stat. Softw. 28, 1–23.

Zhou, X. Y., Shibusawa, N., Naik, K., Porras, D., Temple, K., Ou, H., Kaihara, K., Roe, M. W., Brady, M. J. and Wondisford, F. E. (2004). Insulin regulation of hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein. Nat. Med. 10, 633–637.

ARTICLE 2

A mouse model to study the effects of maternal preconceptional weight loss after diet-induced obesity on the metabolic risk of the offspring

Article en préparation

Panchenko P[1,2], Jouin M[1], Voisin S[1,2], Lemaire M[1], Prezelin A[1], Jean-René S[1], Catonné A[1], Jouneau L[1], Jammes H[1], Baly C[3], Lacroix MC[3], Junien C[1,4] and Gabory A[1]

[1] *INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy-en-Josas, France*

[2] *Ecole Doctorale 394 "Physiologie, physiopathologie et thérapeutique", Université Pierre et Marie Curie, 75252 Paris, France*

[3] *INRA, UR1197, Neurobiologie de l'Olfaction, 78350 Jouy-en-Josas, France*

4 UVSQ, Université Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Guyancourt, France

Introduction

Afin d'améliorer la fertilité et réduire les risques encourus par la femme obèse et son enfant au cours de la grossesse, **il est recommandé de perdre du poids avant la conception** (Paden and Avery, 2012). A ce jour, aucune étude épidémiologique ne s'est focalisée sur les **conséquences à long terme** chez les enfants des femmes obèses ayant suivi une intervention nutritionnelle (Forsum et al., 2013; Matusiak et al., 2014). Chez le rat, les premières études rapportent des effets positifs de l'intervention nutritionnelle préconceptionnelle sur le phénotype de la descendance (Srinivasan, 2005; Zambrano et al., 2010). Cependant, un régime strict, appliqué en période préconceptionnelle chez les femmes obèses, pourrait avoir des effets défavorables à long terme, affectant la réponse au stress, le métabolisme glucidique et/ou le système cardiovasculaire des descendants (Zhang et al., 2011). Dans l'Article 1 nous avons démontré, chez la souris, que l'obésité maternelle provoque une restriction de croissance fœtale au terme de la gestation (Panchenko et al., *soumis*). La perte de poids maternelle préconceptionnelle ne permet pas d'inverser totalement les effets de l'obésité préconceptionnelle : la croissance fœtale au terme de la gestation est améliorée, mais n'est pas complètement restaurée. Une restriction de croissance est associée à un risque accru de développer des maladies métaboliques et cardiovasculaires à l'âge adulte (Desai and Ross, 2011; Ozanne and Hales, 2004). Ainsi, il est nécessaire d'**évaluer les bénéfices et les risques potentiels d'une perte de poids** importante, induite par un régime strict, chez les sujets obèses, sur la santé des enfants à long terme.

Objectifs. Le but de ce travail était de tester les effets à long terme de la perte de poids préconceptionnelle sur le phénotype de la descendance mâle et femelle. Nous avons voulu savoir **si une intervention nutritionnelle, effectuée en amont de la conception, pouvait corriger les effets potentiellement négatifs de l'obésité maternelle** sur le phénotype de la descendance à l'âge adulte.

Résultats et conclusions

Un protocole expérimental, similaire à celui décrit précédemment dans l'article 1, a été utilisé pour les mères F0 (Figure 1 de l'Article 2). Le phénotype des descendants de deux sexes, issus des femelles contrôles (CTRL), obèses (OB) et perte de poids (WL), a été suivi depuis la naissance jusqu'à l'âge de 6 mois. La moitié des descendants ont été soumis à un régime CD

après le sevrage. De plus, nous avons testé la prédisposition des descendants à développer des maladies métaboliques, en soumettant l'autre moitié des animaux au régime HFD.

Nous avons observé que **l'obésité maternelle** chronique, induite par le régime hyperlipidique (HFD), avait **un impact important sur la mortalité néonatale**. La proportion de portées ayant survécu jusqu'au sevrage, est considérablement réduite chez les femelles OB (24%), par rapport aux femelles CTRL (48%). En revanche, **la survie de nouveau-nés est considérablement améliorée chez les femelles WL** (67%).

Les descendants des mères OB présentent une croissance rapide de " rattrapage " avant le sevrage : leur prise de poids est plus rapide et leur poids est supérieur à celui des descendants des mères CTRL. Les souriceaux nés des mères WL ont une vitesse de croissance et un poids corporel équivalents aux souriceaux CTRL. Après le sevrage, nous avons observé que le régime HFD avait un effet primordial sur les paramètres métaboliques des descendants des deux sexes. Cependant, les mâles de mères OB, placés sous HFD, ont une vitesse de prise de poids plus élevée par rapport aux mâles de mères CTRL. Ainsi, **l'environnement post-natal obésogène révèle un effet subtil à long terme de l'obésité maternelle**. De manière intéressante, cet effet de conditionnement d'un phénotype d'obésité aggravée est **spécifique du sexe** : il n'est pas présent chez les femelles. Le phénotype des descendants des mères WL, mâles et femelles, était indistinguable de celui des descendants des mères CTRL. Chez la souris, ce sont les premières preuves montrant que **l'intervention nutritionnelle préconceptionnelle, chez une femelle obèse, améliore la survie néonatale et abolit des conséquences délétères de l'obésité sur le phénotype de la descendance** avant le sevrage et à l'âge adulte.

Nos résultats viennent contribuer, par des preuves scientifiques, aux **recommandations nutritionnelles adressées aux femmes obèses**, en prenant en compte la santé de leurs futurs enfants. D'autres études approfondies, chez l'homme et les animaux de laboratoire, seront nécessaires afin de préciser les fenêtres critiques et la durée de l'intervention nutritionnelle.

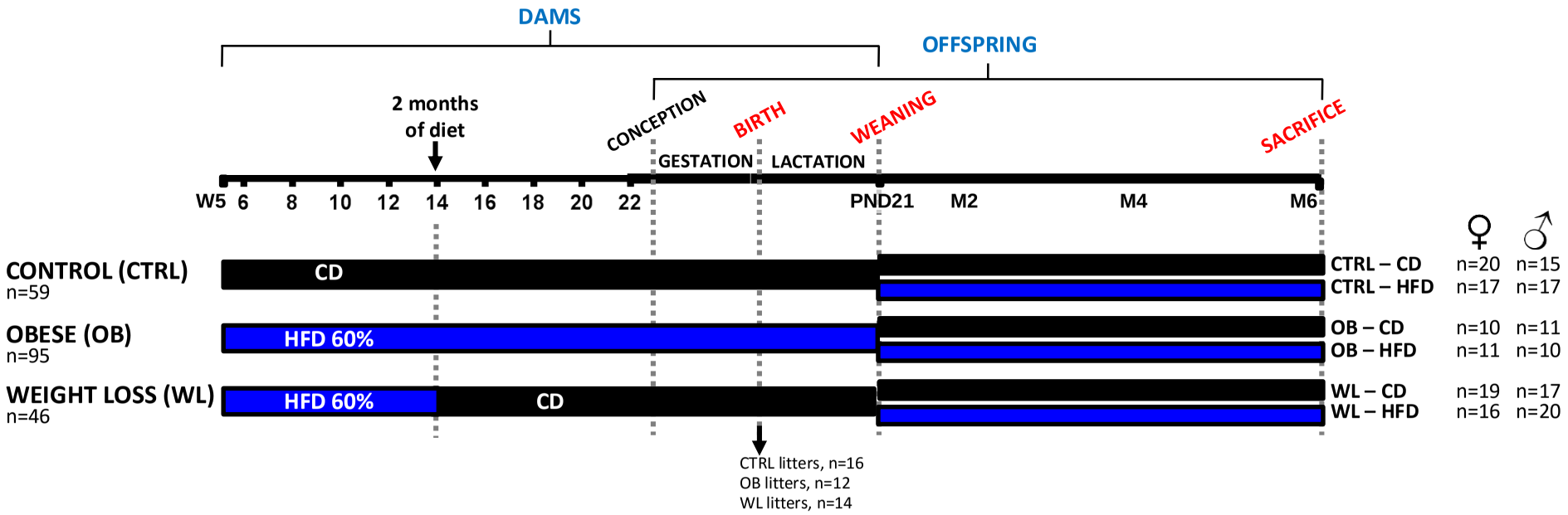


Figure 1. Experimental design.

C57BL-6J females were fed a control diet (CD, black bars) or high-fat diet (HFD, white bars). **Dams:** A first group of dams was under CD (CTRL) and a second group of dams was under HFD (OB) throughout the study. For the third group, after 2 months of HFD, diet was switched to CD (Weight Loss group, WL). After 4 months of preconceptional diet, the females were mated with males under standard diet. Dams delivered spontaneously. At weaning (post natal day PND21), **offspring** were weaned onto CD or HFD, to obtain 6 groups CD-CD, CD-HFD, OB-CD, OB-HFD, WL-CD and WL-HFD. All male and female offspring were followed up longitudinally up to 6 months of age. Number of animals is indicated for each group. Weight and food intake was recorded twice a week. Metabolic parameters (cholesterol, fasting glucose levels and glucose tolerance) were measured for the dams after 2 and 4 months of diet and for the offspring at weaning, at 2, 4 and 6 months of age.

INTRODUCTION

The prevalence of overweight and obesity has dramatically increased in the last 30 years, from 800 million to 2 billion people with a body mass index (BMI) above 25 kg/m^2 worldwide [1]. Obesity is the 5th risk factor for lethality according to the World Health Organisation and is associated to severe conditions such as cardiovascular diseases, stroke, type-2 diabetes, dyslipidemia, sleep disorders, hepatic steatosis, osteoarthritis and cancer. Obesity is also associated with reproductive troubles such as infertility, obstetrical complications, birth defects and stillbirth. To improve the health of women and their children, a preconceptional weight loss is widely recommended to obese women.

Weight loss following bariatric surgery was studied in different human cohorts and appears to have a beneficial effect on obstetrical complications and on obesity in children and teenagers [2,3]. Weight loss in the general population may have either a favourable or a negative impact on birth weight [4,5], but these studies did not record the impact on childhood or teenage metabolic parameters. Remarkably, there is a lack of studies on the effect of diet-induced weight loss in obese women prior to conception on long-term health-related variables in offspring [6,7]. In two rat models, nutritional intervention had beneficial effects on the offspring phenotype, even if all parameters were not normalized [8,9]. However, strict nutritional intervention in the preconceptional period may have long-term benefits on offspring weight gain but deleterious effects on response to stress, glucose metabolism and the cardiovascular system in sheep [10]. Therefore, further research is required to determine the effects of maternal prepregnancy weight loss on metabolic outcomes in the offspring. Novel animal models investigating how preconceptional weight loss impacts offspring health are of interest.

Using a mouse model, we recently reported that maternal obesity (OB) induced fetal growth restriction (FGR), associated with a transcriptional response in fetal liver and placenta. Interestingly, preconceptional weight loss (WL) almost completely abolished this FGR (Panchenko et al, *under review*). However, the effect of previous obesity or the weight loss process was retained in the fetal phenotype, leading to a persistent differential expression of epigenetic machinery genes. Therefore, the WL phenotype is rather an adaptation than a normalization. As FGR is associated with an increased susceptibility to develop metabolic diseases [11,12], the present report attempts to follow-up the phenotype of offspring until adulthood. We placed the offspring either under control (CD) or high-fat diet (HFD) after weaning to investigate whether there is a basal programming or a conditioning effect that would be revealed by diet. We studied both male and female offspring. We observed a mild increased susceptibility to diet-induced obesity only in male offspring. Maternal preconceptional weight loss normalized this phenotype and did not induce a specific phenotype in the male and female offspring. Therefore, our results show that maternal preconceptional weight loss is beneficial for offspring adult health.

METHODS

Animal experiment procedures. The COMETHEA ethical committee (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale), registered with the national Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale under the n°45, approved this protocol (visa 12/062). Four-week-old female and 7-week-old male C57Bl/6J mice were purchased from Harlan Laboratory (Venray, Netherlands) and housed in Unité d'Infectologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons (IERP; INRA, Jouy-en-Josas, France). After one week of adaptation, the mice were placed in individual cages at controlled temperature (22 ± 2° C) with a 12 h light /12 h dark cycle. Mice had ad libitum access to water and food and paper towel was provided for nest building. F0 and F1 mice and food were weighted twice a week. Caloric intake was calculated with 3.85 kcal/g for CD and 5.24 kcal/g for HFD. Caloric intake to body weight ratio (kcal / kg of body weight / day) was calculated for each mouse.

Dams. From 5 weeks, female C57BL/6J mice were fed a high-fat diet (HFD #D12492: 59.9kcal% fat, 20.1kcal% carbohydrate and 20kcal% proteins) or a matched control diet (CD #D12450K: 10kcal% fat and 70kcal% carbohydrate and 20kcal% proteins), purchased in pellet form from Research Diets (New Brunswick, NJ, USA, #D12492 and #D12450K respectively). At 14 weeks, after 2 months of HFD, mice with a weight above the threshold of mean CTRL weight + 2 standard deviations, considered to

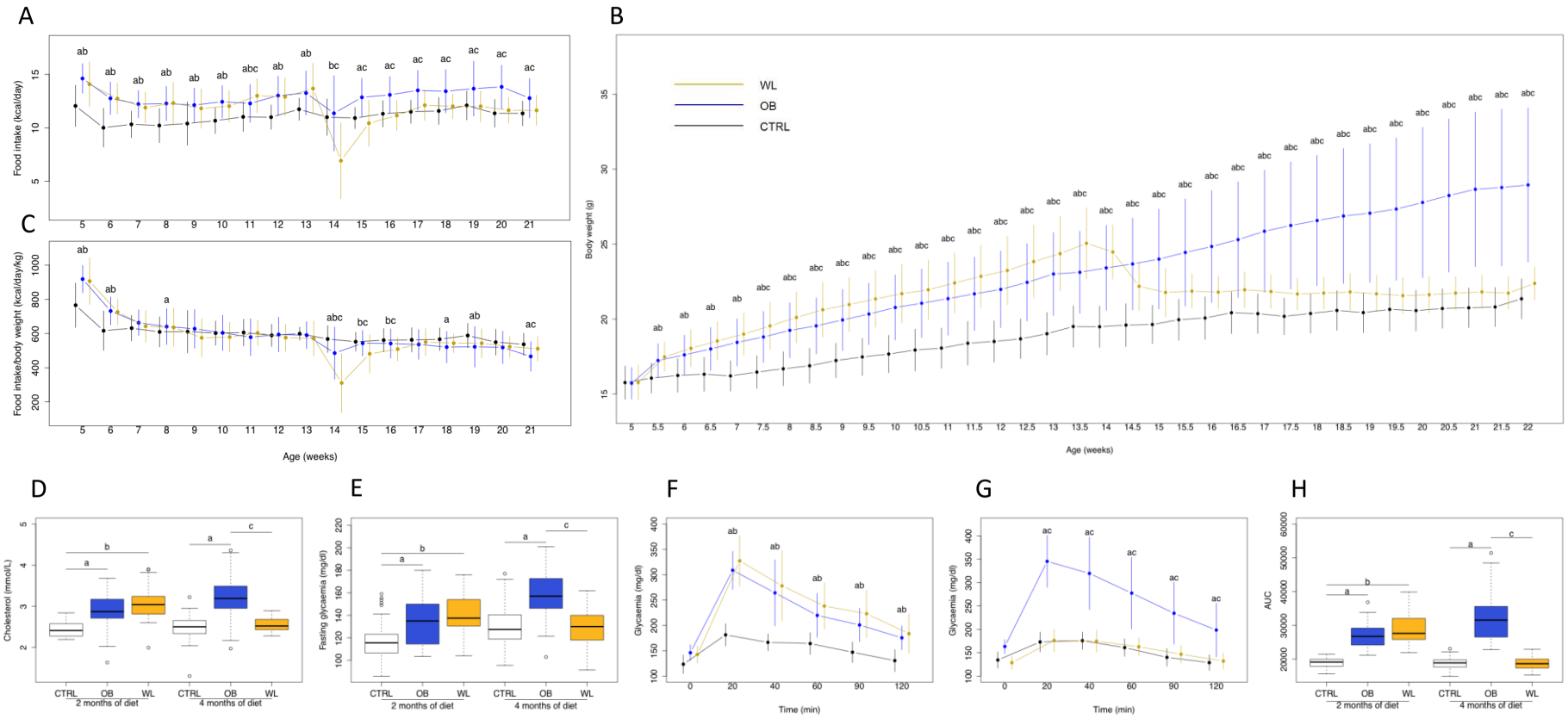


Figure 2. Body weight and metabolic parameters of obese (OB) and weight loss (WL) females during the preconceptional period.

(A) Food intake (kcal/day). OB females were hyperphagic during 4 months of preconceptional diet. After diet change WL females reduced drastically their FI during 1 week. After 15 weeks their FI was equal comparing with CTRL females and less than in OB females. CTRL (n = 20-60), OB (n = 47-95), WL (n = 12-46). **(B) Body weight**. During first 2 months, the OB females were heavier than control (CTRL) females. Diet switch from HFD to CD at 14 weeks induced a weight loss in WL group and normalization of their body weight. CTRL (n = 60), OB (n = 95), WL (n = 45). **(C) Food intake per body weight** (kcal/day/kg BW), CTRL (n = 20-60), OB (n = 47-95), WL (n = 12-46). **(D) Total plasma cholesterol levels**. The OB females were hypercholesterolemic. WL females were hypercholesterolemic after 2 months under HFD but normalized their cholesterol levels at mating (4 months of diet). CTRL (n = 35-37) OB (n= 46-71) WL (n = 30-34). **(E) Fasting glycaemia**. The OB females were hyperglycaemic. WL females were hyperglycaemic after 2 months under HFD but normalized their at mating. CTRL (n = 40-60) OB (n= 46-95) WL (n = 34-45). **(F) OGTT after 2 months of preconceptional diet**. n=22-25 per group. **(G) OGTT after 4 months of preconceptional diet**. n=35-48 per group. **(H) Area under curve (AUC).** n=22-48 per group. The OB females were glucose intolerant as compared to CTRL. WL females were glucose intolerant after 2 months under HFD but normalized at mating.

Data expressed as mean ± St. Dev (A, B, C, F, G) or as Tukey boxplot (D, E, H; the median is indicated by a horizontal line, the bottom of the box represents the 25th percentile, the top the 75th percentile, outliers are shown as dots). (a) $P < 0.05$ OB *vs.* CTRL, (b) $P < 0.05$ WL *vs.* CTRL, (c) $P < 0.05$ WL *vs.* OB.

have a sufficient weight gain [13], were sorted by weight. One on two females was assigned to CD for the next two months in order to induce a weight loss (WL group). The remaining mice stayed on HFD to induce a chronic obesity (OB group). Mice of the control group received CD for the 4 months in preconception period (CTRL; Figure 1). Measurements of fasting cholesterolemia, glycaemia, insulinemia and oral glucose tolerance test (OGTT) were performed at the age of 13 and 22 weeks. From 23 weeks of age, females were mated with chow-fed C57BL/6J males (Special diets services, Witham, Essex, England; #801030 RM3A) for one night. If no vaginal plug was observed, female was mated with another male according to their oestrus cycle. The reproduction period last for 6 weeks. Females remained on their experimental diets through pregnancy and lactation. All female mice delivered by spontaneous vaginal delivery. To obtain the sufficient number of offspring, we used two different season-matched F0 cohorts.

Offspring. At postnatal day (PND) 1, litters were reduced to six pups when necessary. From PDN7 to PDN21, F1 were weighted every 2 days. Pups remained with their biological mothers until weaning at PDN21. Male and female F1 were weaned onto CD or HFD. Six groups in F1 generation were obtained (Figure 1): offspring of CTRL mothers weaned onto CD (CTRL/CD) or HFD (CTRL/HFD), offspring of obese mothers weaned onto CD (OB/CD) or HFD (OB/HFD) and offspring of WL mothers weaned onto CD (WL/CD) or HFD (WL/HFD). For each group, male and female were studied. Measurements of fasting cholesterolemia, glycaemia, insulinemia and oral glucose tolerance test (OGTT) were performed at weaning and at the age of 2, 4 and 6 months. Day/night food intake was recorded during 1 week at the age of 1 and 4 months. F1 were sacrificed at the age of 6 months.

Assessment of glucose metabolism. OGTT was performed in a subset of F0 mice, as previously described (Panchenko et al, *submitted*) and in all F1 offspring. Briefly, after 6 hours fasting (8:00 am to 2:00 pm), a bolus of glucose (2 g/kg of body weight) was delivered into the stomach of conscious mice with a gavage needle. Glycaemia was measured at time 0, 20, 40, 60, 90 and 120 min. Insulinemia was measured at time 0, 20 and 60 min, except for the F1 at weaning. The trapezoidal method was used to calculate the area under the curve (AUC) (auc function of the *flux* package in R) considering only values above the fasting level. Glycaemia from tail vein blood was measured in duplicate using an Accu-Chek Performa blood glucose meter (Roche diagnostics GmbH, Germany). Tail vein blood (30µl) was collected in microvette tubes (Stardstedt), centrifuged for 10 min at 4600 rpm at 4° C. Insulinemia was measured with Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA (Alpco, #80-INSMSU), according to the manufacturer's instruction. Fasting glycaemia and insulinemia were measured in all F0 females and F1 offspring. Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated as: *fasting glycaemia(mol/L)*insulinemia(mol/L)/22.4.*

Assessment of lipid metabolism. After 6 hours of fasting, submandibular vein blood (300 µl) from conscious mice was collected in tubes containing 5 U.I. of heparin (Choay heparin, Sanofi-aventis, Paris, France). Blood samples were centrifuged for 10 min at 1500 g at 20°C. Plasma was collected and stored at -20°C. For F0, total cholesterol level was measured by colorimetric dosage on Vitros system in Ambroise Paré Hospital (Boulogne-Billancourt, France).

Assessment of body composition. Offspring, at the age of 6 months, were weighted and sacrificed by cervical dislocation after 5-8 hours of fasting (from 8:00 am to 13:00-16:00). We recorded the weight of the different tissues: subcutaneous (SC WAT), perirenal (PR WAT) and perigonadal (PG WAT) white adipose tissues, liver, kidney, heart and brown adipose tissue (BAT). The data are presented as ratio of organ weight to body weight.

Statistical analysis. Linear mixed models were used to model the evolution of parameters with time, using the lmer function of the *lme4* package in R. Estimates of the slopes for each parameter were also reported as "β". Reported p-values were obtained with a likelihood-ratio test, thanks to the lrtest function of the *lmtest* package. Model is composed as *parameter ~ group + time + group*time + cohort + (1+time|Female)* for F0 and *parameter ~ mat.group + tim + diet*time + mat.group*time + diet*mat.group*time + cohort + (1+time|pup)* for F1.

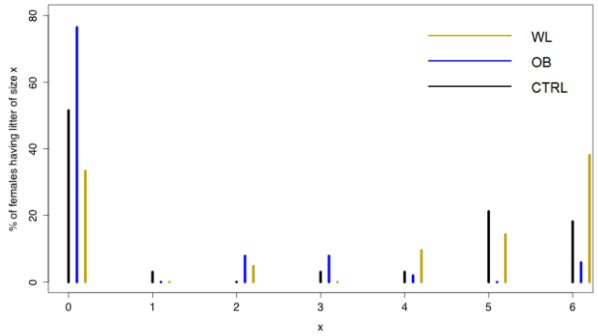


Figure 3. Pup survival in CTRL, OB and WL dams.

Proportion of litter weaned with 0, 1, 2, 3, 4, 5 or 6 littermates as regard as number of delivery (n= 33 CTRL litters, 51 OB and 21 WL). The distribution is significantly different for OB dams as compared to CTRL and WL (Kruskal-Wallis test p=0.00017; post-hoc Wilcoxon with Bonferroni correction OB vs. CTRL p=0.017; WL vs. OB p=0.00020; WL vs. CTRL p=0.39). OB dams have completely abandoned a larger number of litter (litter size at weaning = 0). Moreover, in the litter for which pups were weaned, the number of survivors was lower.

ANOVA were used to test differences at each time point, thanks to the aov function. For most investigated parameters, groups had unequal variances because of variable response to HFD. Therefore, investigated parameters were Boxcox transformed, using the powerTransform and bcPower functions of the *car* package. Reported p-values were obtained with a likelihood-ratio test, thanks to the lrtest function of the *lmtest* package. All p-values were adjusted for multiple comparisons using the p.adjust function with BH correction [14]. If significant effect was found, Tukey's post-hoc test was used to determine which groups differed from one another. Effect size was reported as the proportion R^2 of the variance in the variable of interest. ANOVA is composed as *parameter ~ group + cohort* for F0 and *parameter ~ mat.group + diet + cohort + diet:Mat.group* for F1. Male and female offspring were tested separately as a sexual dimorphism was observed for most parameters.

RESULTS AND DISCUSSION

Preconceptional weight loss normalizes the metabolic parameters of obese dams

Using the same mouse model, we recently reported the effect of maternal obesity and preconceptional weight loss (WL) on fetal growth (Panchenko et al., *under review*). In the present study, we repeated the experiment using two batches of mice to obtain the offspring. Females under HFD had greater caloric intake than females under CD (Figure 2A). Therefore, females of the obese group (OB) put on weight faster than females of the control group (CTRL) up to mating (β=0.38, p<0.001), and were heavier at each time point from week 5.5 onwards (Figure 2B). WL females were heavier than CTRL females at each time point up to dietary intervention (Figure 2B). WL females were also heavier than OB females up to diet change, due to a biased animal assignment to the WL group, as mice that put on less weight were assigned to the OB group (see methods). As early as three days after diet change and up to mating, WL females were leaner than OB females (Figure 2B). The important drop in caloric intake during week 14 could explain this quick weight loss (Figure 2A). Diet explains 24% or the variance in weight at week 5.5 and 64% of the variance at week 22. Interestingly, the caloric intake to body weight ratio was similar in the three groups at most time points in the preconceptional period, indicating a normal regulation of feeding behavior in HFD fed females (Figure 2C). After two months under HFD, OB and WL females were hypercholesterolemic, hyperglycemic and glucose intolerant (Figure 2D, 2E, 2F). At mating, OB females kept these disturbances in glucose and lipid metabolism, while all WL females normalized these metabolic parameters (there was no extreme- or non-respondent individual) (Figure 2D, 2E, 2G).

The time window of HFD exposure seems to be critical as short and long-term effects might be different according to duration and timing [15–17]. In our study, exposure to HFD began before puberty. The nutritional intervention in WL females was performed after the end of puberty. WL females had a quick drop in weight after diet change, which is explained by an important food neophobia for CD. The females likely experienced a stress that is not strictly nutritional and this must be kept in mind in the WL phenotype. In humans, weight loss after massive obesity usually stretches over a long period of time. The critical periods for nutritional intervention are neither reported in human nor rodents [6]. In rats, one month of CD caused maternal weight loss [9]. In our model, OB females developed obesity and features of metabolic syndrome at mating, while WL females were similar to CTRL but were 5% heavier. Therefore, our model is a suitable model for human studies, even if comparisons between mouse and obese patient must always be made with caution.

Pups survival is improved by maternal weight loss

The average crossing time (CTRL 3.3±2.2 days; OB 2.8±1.8; WL 2.9±1.7) and the proportion of gestation loss (CTRL 6%; OB 4%; WL 9%, p=0.62) were similar in the three groups of females. ANOVA indicated a difference in gestation time (CTRL 19.5±0.6; OB 19.8±0.9; WL 19.4±0.5 days; p=0.01) but posthoc test indicated only a non-significant trend toward longer gestation time for OB mice (p=0.08 *vs*. CTRL and p=0.10 *vs*. WL) but diet explains only 6% of variance in this parameter. At postnatal day 1 (PDN1), we adjusted the litter size to a maximum of 6 pups and we observed that maternal group had a major effect on pups mortality during the first week. Considering the number of litters for which at least one pup was weaned, this proportion was 48% in CTRL, 24% in OB and 67% in WL females. Moreover, OB females weaned fewer pups per delivered litter than CTRL or WL females (Figure 3; p=0.00017; post-hoc test: OB *vs*. CTRL p=0.017; WL *vs*. CTRL p=0.39; WL *vs*. OB

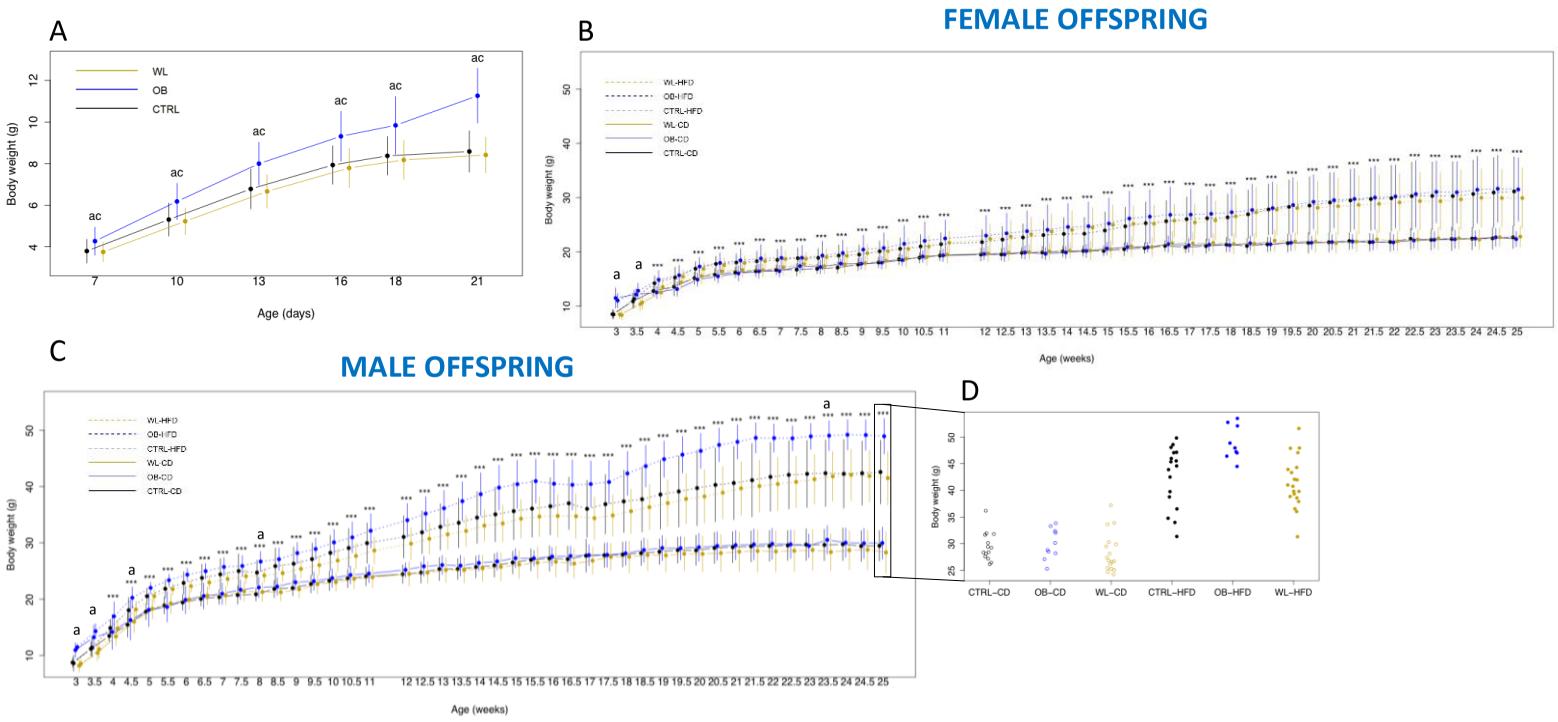


Figure 4. Body weight of offspring born to control (CTRL), obese (OB) and weight loss (WL) dams.

(A) Body weight (BW) in the pre-weaning period. Male and female data were pooled because no sex effect was detected. F1 born to OB dams put on weight faster (β=0.13, p<0.001) and are heavier than CTRL pups at all time points (p<0.001). WL pups are not different from CTRL.
(B) Body weight of female offspring after weaning. Mice under HFD (dashed lines) were heavier than mice under CD (plain lines) for all time point after 4 weeks. Offspring born to OB dams are heavier than CTRL at weeks 3 and 3.5. After 6 weeks, ther was no persistant maternal effect. CTRL-CD n=20, CTRL-HFD n=17, OB-CD n=10, OB-HFD n=11, WL-CD n=19, WL-HFD n=16. **(C) Body weight of male offspring after weaning.** Mice under HFD (dashed lines) were heavier than mice under CD (plain lines) for all time point after 4 weeks. Offspring born to OB dams are heavier than CTRL at weeks 3, 3.5, 4.5 and 8. After 8 weeks, ther was no persistent maternal effect. CTRL-CD n=15, CTRL-HFD WL-CD n=17, WL-HFD n=20. **(D) Scatter plot showing the distribution of BW in male offspring at 25 weeks of age.** In the OB-HFD groun=17, OB-CD n=**10**, OB-HFD n=**9**, p, all animals grouped in the highest weights. Data expressed as mean ± St. Dev (A, B, C) or as scatter plot (D). (***) P<0.01 HFD *vs.* CD, (a) *P < 0.05* OB *vs.* CTRL, (b) *P < 0.05* WL *vs.* CTRL, (c) *P < 0.05* WL *vs.* OB.

p=0.00020). Therefore, maternal obesity impaired maternal behavior and increased pups mortality while preconception weight loss normalized or even improved the offspring survival.
The C57BL/6J strain is characterized by important perinatal mortality, mainly explained by a low maternal behavior [18]. HFD might act as a strong stress factor perturbing maternal behavior and thus leading to increased pup mortality in this strain [19]. However, we did not observed particular cannibalistic behavior in the mothers; pups were rather abandoned at a safe distance from the maternal nest. Another possible explanation would be a delay in lactation [20,21]. A detailed study of the mammary gland development in obese female would be interesting to better understand the reasons for increased abandonment of litters.

Early post-natal growth curve is improved by preconceptional maternal weight loss
We previously showed that maternal obesity induced FGR (-13%) and increased the proportion of small for gestational age fetuses (SGA: 28%) at term of gestation. This effect was only partially corrected in WL females: a FGR of 5% was observed but the proportion of SGA was normalized to that of CTRL females (Panchenko et al., *under review*). As pups survival was impaired in the early postnatal period, we did not weigh the offspring during the first week but from PND7 onwards. During the pre-weaning period, the offspring born to OB dams put on weight faster than offspring born of CTRL dams (β=0.13, p<0.001; Figure 4A). At weaning, male and female OB offspring had higher fasting glycaemia and presented impaired glucose tolerance compared with CTRL offspring (p<0.001; Figure 5 and 6A), with maternal group explaining 24% of the variance in fasting glucose and 49% in OGTT area under the curve (AUC). However, it does not seem to have functional consequences for insulin resistance, as HOMA-IR was similar between groups. For all parameters, WL offspring did not differ from CTRL animals.
Offspring of obese mothers seemed to show a quick catch-up growth, which is a bad prognosis for long-term metabolic health [22]. Preconceptional maternal weight loss normalized the early post-natal growth in the offspring. However, considering the important mortality, we cannot exclude that only the strongest newborns, with highest birthweight, survived in our study. The apparent catch-up growth between E18.5 and PND7 would therefore be an artefact. Alternatively, lactation could also be responsible for such an effect. Milk of obese mother has a modified composition [23,24].

Maternal obesity has few persistent effects and preconceptional weight-loss does not induce a specific phenotype in the offspring
After weaning, half of the offspring was fed a HFD and the other half a CD (Figure 1). As expected, mice fed a HFD gained more weight than animals fed a CD (Figure 4B, C) and their glucose metabolism was impaired (hyperglycemia, insulinemia, insulin resistance, glucose intolerance; Figure 5). The effect of maternal weight trajectories on offspring weight was quickly replaced by the effect of post-weaning diet. Females born to OB dams were heavier than females born to CTRL dams at weeks 3 and 3.5. Males born to OB dams were heavier than males born to CTRL dams at weeks 3, 3.5, 4.5, 8 and 23.5: the weight of the OB-HFD animals were in the higher range (Figure 4D). However, this effect is small, as maternal group explains only 2% of the variance in weight at 6 months of age. Moreover, for males only, there was an interaction between maternal group, diet and time: pups from OB dams under HFD put on weight faster than pups from CD dams under HFD (β=0.26, p=0.0049) (Figure 4B, C). Given the small number of males in the OB-HFD group and the high variability in the CTRL-HFD group, statistical power for the comparison was between 14 and 65% for each time point. We therefore cannot exclude that OB-HFD weight was affected by maternal obesity. Increasing the number of animals per group would increase the statistical power. Considering the high variability under HFD and pup mortality, the number of dams that would be needed to obtain a sufficient sample size would not be ethically acceptable. There was no difference in body weight between WL-HFD and CTRL-HFD groups in both sexes.
Post-weaning HFD altered glucose metabolism in both sexes in the offspring. Maternal group had no additional effect on glucose metabolism and no effect on the parameters evolution between 2, 4 and 6 months of age (Figure 5). Body composition was not affected by maternal group in female offspring at 6 months of age. Males from OB dams had heavier kidneys and hearts than males from WL dams (p=0.00047 and p=0.0053 respectively; Table 1). However, there was no difference between males from OB and CTRL dams and from WL and CTRL dams. Adiposity was increased under HFD, but there was

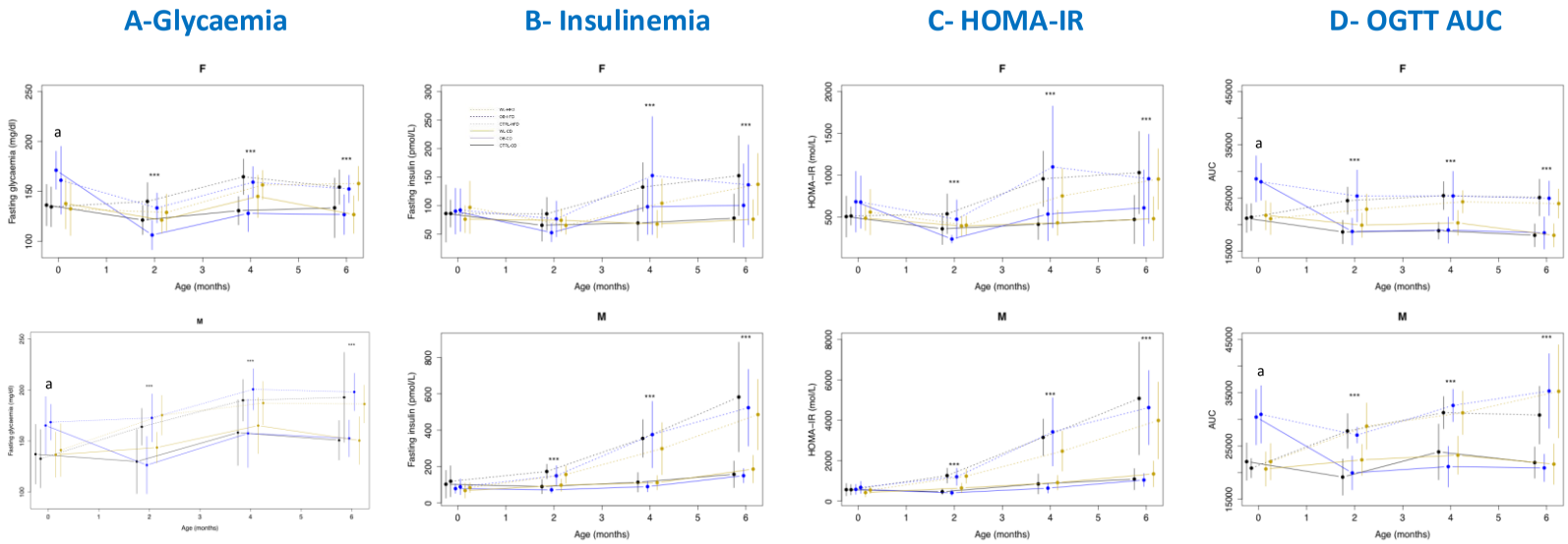


Figure 5. Metabolic parameters of female (top panels) and male (bottom panels) offspring born to control (CTRL), obesae (OB) and weight loss (WL) dams fed a control (plain lines) or a HFD (hatched lines).

(A) Fasting glycaemia. **(B) Fasting insulinemia**. **(C) Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR). (D) OGTT area under curve (AUC).**
At weaning, pups from OB dams had higher fasting glucose than CTRL and were glucose intolerent but no differences was observed fot insulinemia and HOMA-IR. At 2, 4 and 6 months, in males and females, no persistant difference between maternal groups for glycemia and glucose tolerence and no effect of maternal groups was observed for insulinemia and HOMA-IR. HFD-fed mice were hyperglycemic, have higher insulin levels, higher HOMA-IR and were glucose intolerent, as compared to CD-fed. Females: CTRL-CD n=20, CTRL-HFD n=17, OB-CD n=10, OB-HFD n=11, WL-CD n=19, WL-HFD n=16. Males: CTRL-CD n=15, CTRL-HFD n=17, OB-CD n=11, OB-HFD n=10, WL-CD n=17, WL-HFD n=20.
Data expressed as mean ± St. Dev (***) P<0.01 HFD *vs.* CD, (a) $P < 0.05$ OB *vs.* CTRL, (b) $P < 0.05$ WL *vs.* CTRL, (c) $P < 0.05$ WL *vs.* OB.

no influence of maternal group (Table 1). We performed a principal component analysis on all studied tissues in order to have an overview of the sample clustering. Samples clustered according to the post-weaning diet, but there was no clustering according to maternal group.

Therefore, there was no persistent effect of maternal obesity on the offspring phenotype, except for a slight conditioning of body weight in males in an obesogenic environment. Epidemiological studies in humans and numerous studies in rat, mouse, rabbit and primates reported a conditioning effect of maternal obesity or high energy feeding on the offspring susceptibility to develop metabolic diseases in adulthood [25,26]. These effects might be subtle and only revealed by an obesogenic environment. We indeed hypothesized a two-hit model: maternal exposure corresponds to the first event and the individual's own environment corresponds to the second event. Using the term 'conditioning' is therefore more suitable than the commonly used term 'programming' [27]. Recently, several reports in mouse showed that maternal obesity has little or no effect on the offspring [28–30]. King and colleagues observed that in C57BL/6, weight gain in the first generation was mostly explained by the post-weaning diet while the second generation experienced a retentive effect of HFD in F0. Platt and colleagues tested different maternal diets and observed no apparent effect in ICR mice offspring fed a CD. In another study, the authors tested the effect of obesity during the preconceptional period only, during gestation only or both. They found that only a HFD exposure during gestation resulted in obesity and impaired glucose tolerance in adulthood. It suggests that the progeny was unable to adapt to an abnormal HFD gestational milieu, while chronic exposure to HFD allowed an adaptation in offspring [17] The literature is varied and the data are difficult to assemble due to a wide range of protocols (exposure time window), diets (HFD or western diet), mouse strains and many negative studies might not have been published.

We previously showed that preconceptional weight loss appeared beneficial to fetal growth, but some effects of previous obesity were retained in the offspring. Indeed, WL fetuses did not completely normalize fetal growth, placental and hepatic gene expression patterns (Panchenko et al, *submitted*). In the present long-term study, maternal preconceptional weight loss normalized offspring weight and did not cause a deleterious metabolic phenotype. Therefore, it seems beneficial not only for the mother's health and fertility, but also for the health of the offspring.

We focused our phenotypic study on weight gain and glucose-insulin homeostasis. Other parameters such as cardio-renal function might be affected [31]. Maternal chronic HFD conditions the offspring to increased anxious behavior. This predisposition is associated with alterations in the expression of genes encoding serotonin and GABA neurotransmitter receptors [32,33]. Feeding behaviour is also altered in offspring of obese mothers [26,34]. In our model, CD or HFD was imposed on the offspring, so food motivation was not assessed. Having the choice between balanced and palatable foods might reveal a conditioning of the offspring's food preferences by maternal metabolism.

CONCLUSIONS

We previously showed that maternal obesity induced FGR at term, linked with modifications of the expression of epigenetic machinery genes, particularly the histone acetylation pathway, in placenta and fetal liver. This phenotype was almost completely abolished by maternal weight loss. As FGR has been associated with adult-onset metabolic diseases [35], we explored the effect of maternal weight trajectories on weight gain and glucose-insulin homeostasis in growing and then adult offspring. In our model, maternal obesity had a major impact on offspring survival and weight before weaning. However, we observed only a small persistent effect of maternal obesity on male offspring diet-induced obesity but no conditioning effect on glucose metabolism after weaning until 6 months of age. Maternal preconceptional weight loss was beneficial for pup survival and male weight gain, and did not induce a particular phenotype in the offspring.

Although it is a major public health issue, few animal models of preconceptional weight loss by nutritional intervention after diet-induced obesity were developed [8,9]. The present report is the first descriptive study in mice, and it suggests favourable effects of maternal preconception weight loss. Our mouse model is relevant for unravelling the mechanisms involved in human obesity. It is still unknown whether the offspring born to WL dams is phenotypically equivalent to offspring born to CTRL dams in adulthood or whether it presents some persistent effects of early maternal obesity (Panchenko et al, *submitted*). This "memory" of the maternal environment may be retained in oocytes via epigenetic marks apposed during puberty [10,36]. This aspect needs further investigation.

Table 1. Body composition of offspring at sacrifice.

Organ weights are presented as percentage of body weight, indicated as mean ± St. Dev.
WAT – white adipose tissue, SC – subcutaneous, PG – perigonadal, PR – perirenal, BAT – brown adipose tissue.

	BODY WEIGHT	SC WAT	PG WAT	PR WAT	Total WAT	BAT	KIDNEYS	HEART	LIVER
Female offspring									
CTRL-CD, n=20	22.3 ± 2.1	2.66 ± 1.01%	2.61 ± 0.79%	0.82 ± 0.28%	6.09 ± 1.96%	0.35 ± 0.08%	1.13 ± 0.16%	0.54 ± 0.07%	3.65 ± 0.48%
OB-CD, n=10	22.0 ± 1.2	2.13 ± 0.57%	2.36 ± 0.48%	0.79 ± 0.19%	4.94 ± 1.35%	0.30 ± 0.14%	1.21 ± 0.11%	0.57 ± 0.05%	3.78 ± 0.44%
WL-CD, n=19	21.7 ± 1.8	2.31 ± 0.57%	2.49± 0.63%	0.82 ± 0.24%	5.62 ± 1.31%	0.40 ± 0.13%	1.10 ± 0.14%	0.55 ± 0.06%	3.62 ± 0.52%
CTRL-HFD, n=20	30.4 ± 6.4	6.25 ± 1.82%	7.42 ± 2.57%	2.23 ± 0.66%	15.90 ± 4.71%	0.39 ± 0.16%	0.86 ± 0.25%	0.45 ± 0.08%	2.83 ± 0.32%
OB-HFD, n=10	31.5 ± 5.8	5.36 ± 2.19%	7.55 ± 1.74%	2.31 ± 0.76%	15.22 ± 3.57%	0.42 ± 0.21%	0.96 ± 0.06%	0.46 ± 0.04%	2.75 ± 0.34%
WL-HFD, n=16	29.7 ± 6.0	5.97 ± 2.18%	6.85 ± 2.25%	2.22 ± 0.82%	15.04 ± 4.96%	0.38 ± 0.12%	0.91 ± 0.13%	0.44 ± 0.06%	2.80 ± 0.41%
post-weaning diet	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	NS	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01
maternal group	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Male offspring									
CTRL-CD, n=15	28.4 ± 2.7	2.51 ± 0.80%	3.16 ± 1.31%	1.32 ± 0.56%	6.98 ± 2.57%	0.51 ± 0.15%	1.17 ± 0.19%	0.53 ± 0.08%	3.42 ± 1.31%
OB-CD, n=10	29.7 ± 1.2	2.46 ± 0.57%	3.19 ± 0.48%	1.20 ± 0.19%	6.85 ± 1.35%	0.47 ± 0.14%	1.26 ± 0.11%	0.58± 0.05%	3.43 ± 0.44%
WL-CD, n=17	27.9 ± 3.3	2.64 ± 0.94%	3.20 ± 1.31%	1.38 ± 0.81%	7.35 ± 2.93%	0.48 ± 0.18%	1.06 ± 0.12%	0.51 ± 0.06%	3.46 ± 0.46%
CTRL-HFD, n=17	41.7 ± 5.5	6.75 ± 0.94%	5.75 ± 1.62%	3.34 ± 0.62%	15.84 ± 1.57%	0.66 ± 0.31%	0.86± 0.11%	0.41 ± 0.07%	3.24 ± 0.88%
OB-HFD, n=10	46.1 ± 4.9	7.27 ± 1.53%	5.15 ± 1.12%	3.90 ± 0.75%	16.32 ± 1.88%	0.82 ± 0.46%	0.92 ± 0.11%	0.42 ± 0.08%	3.37 ± 0.58%
WL-HFD, n=19	41.0 ± 4.8	6.65 ± 0.90%	6.30 ± 1.35%	3.06 ± 0.65%	16.01 ± 1.46%	0.56 ± 0.24%	0.84 ± 0.07%	0.37 ± 0.04%	3.04 ± 0.50%
post-weaning diet	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	*p*<0.01	NS	*p*<0.01	*p*<0.01	NS
maternal group	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*p*=0.00047 (OB *vs.* WL)	*p*=0.0053 (OB *vs.* WL)	NS

Our model can be meaningful to the broader community of biologists and also to practitioners since they are linked with recommendations to lose excess weight before pregnancy to improve perinatal outcomes. This seems to have also potential benefits for adult health.

Acknowledgements

We thank Alexandr Baklanov, Didier Durieux, Karine Badonnel and Nicolas Meunier for their help in experimental procedures. We thank the members of the Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons Unit (UE 0907) of the INRA (Jouy-en-Josas) for their professionalism and help with animal experiments. We are grateful to Aurélia Bruneau for sharing with us her expertise in OGTT experiments. This study was supported by the Fondation Coeur et Artères (FCA 13T1) and Institut Benjamin Delessert. PEP and SV were supported by funding from the Ministère de la Recherche.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. Ng M. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 384: ed. 2014 May 29;766–81.
2. Kjaer MM, Nilas L. Pregnancy after bariatric surgery - a review of benefits and risks: Pregnancy after bariatric surgery. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2013;92:264–71.
3. Smith J, Cianflone K, Biron S, Hould FS, Lebel S, Marceau S, et al. Effects of Maternal Surgical Weight Loss in Mothers on Intergenerational Transmission of Obesity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2009;94:4275–83.
4. Diouf I, Charles MA, Thiebaugeorges O, Forhan A, Kaminski M, Heude B, et al. Maternal weight change before pregnancy in relation to birthweight and risks of adverse pregnancy outcomes. Eur. J. Epidemiol. 2011;26:789–96.
5. Villamor E, Cnattingius S. Interpregnancy weight change and risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study. The Lancet. 2006;368:1164–70.
6. Forsum E, Brantsæter AL, Olafsdottir A-S, Olsen SF, Thorsdottir I. Weight loss before conception: A systematic literature review. Food Nutr. Res. 2013;57.
7. Matusiak K, Barrett HL, Callaway LK, Nitert MD. Periconception Weight Loss: Common Sense for Mothers, but What about for Babies? J. Obes. 2014;2014:1–10.
8. Srinivasan M. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. AJP Endocrinol. Metab. 2005;290:E129–34.
9. Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Rodríguez-González GL, Nathanielsz PW. RAPID REPORT: Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats: Dietary intervention to reverse metabolic programming outcomes. J. Physiol. 2010;588:1791–9.
10. Zhang S, Rattanatray L, Morrison JL, Nicholas LM, Lie S, McMillen IC. Maternal Obesity and the Early Origins of Childhood Obesity: Weighing Up the Benefits and Costs of Maternal Weight Loss in the Periconceptional Period for the Offspring. Exp. Diabetes Res. 2011;2011:1–10.
11. Desai M, Ross MG. Fetal programming of adipose tissue: effects of intrauterine growth restriction and maternal obesity/high-fat diet. Semin. Reprod. Med. 2011;29:237–45.
12. Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. Nature. 2004;427:411–2.
13. Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross M-S, Boileau C, Rabes J-P, Fruchart-Najib J, et al. Resistance to high-fat diet in the female progeny of obese mice fed a control diet during the periconceptual, gestation, and lactation periods. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007;292:E1095–100.
14. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol. 1995;57:289–300.
15. Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. Am. J. Obstet. Gynecol. 2010;203:495.e1–495.e8.
16. Plata M del M, Williams L, Seki Y, Hartil K, Kaur H, Lin C-L, et al. Critical periods of increased fetal vulnerability to a maternal high fat diet. Reprod. Biol. Endocrinol. RBE. 2014;12:80.
17. Sasson IE, Vitins AP, Mainigi MA, Moley KH, Simmons RA. Pre-gestational vs gestational exposure to maternal obesity differentially programs the offspring in mice. Diabetologia. 2015;58:615–24.
18. Weber EM, Algers B, Würbel H, Hultgren J, Olsson I a. S. Influence of Strain and Parity on the Risk of Litter Loss in Laboratory Mice. Reprod. Domest. Anim. [Internet]. 2013 [cited 2015 Oct 22];48. Available from: http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1439-0531.2012.02147.x
19. Bellisario V, Panetta P, Balsevich G, Baumann V, Noble J, Raggi C, et al. Maternal high-fat diet acts as a stressor increasing maternal glucocorticoids' signaling to the fetus and disrupting maternal behavior and brain activation in C57BL/6J mice. Psychoneuroendocrinology. 2015;60:138–50.

20. Flint DJ. Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland. AJP Endocrinol. Metab. 2005;288:E1179–87.

21. Saben JL, Bales ES, Jackman MR, Orlicky D, MacLean PS, McManaman JL. Maternal Obesity Reduces Milk Lipid Production in Lactating Mice by Inhibiting Acetyl-CoA Carboxylase and Impairing Fatty Acid Synthesis. López M, editor. PLoS ONE. 2014;9:e98066.

22. Dessì A, Ottonello G, Fanos V. Physiopathology of intrauterine growth retardation: from classic data to metabolomics. J. Matern. Fetal Neonatal Med. 2012;25:13–8.

23. Bautista CJ, Montaño S, Ramirez V, Morales A, Nathanielsz PW, Bobadilla NA, et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. Br. J. Nutr. 2015;1–9.

24. Hue-Beauvais C, Chavatte-Palmer P, Aujean E, Dahirel M, Laigre P, Péchoux C, et al. An obesogenic diet started before puberty leads to abnormal mammary gland development during pregnancy in the rabbit. Dev. Dyn. 2011;240:347–56.

25. Li M, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal Obesity and Developmental Programming of Metabolic Disorders in Offspring: Evidence from Animal Models. Exp. Diabetes Res. 2011;2011:1–9.

26. Williams L, Seki Y, Vuguin PM, Charron MJ. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. 2014;1842:507–19.

27. Hanson MA, Gluckman PD. Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? Physiol. Rev. 2014;94:1027–76.

28. King V, Dakin RS, Liu L, Hadoke PWF, Walker BR, Seckl JR, et al. Maternal Obesity Has Little Effect on the Immediate Offspring but Impacts on the Next Generation. Endocrinology. 2013;154:2514–24.

29. King V, Norman JE, Seckl JR, Drake AJ. Post-weaning diet determines metabolic risk in mice exposed to overnutrition in early life. Reprod Biol Endocrinol. 2014;12:73.

30. Platt KM, Charnigo RJ, Pearson KJ. Adult offspring of high-fat diet-fed dams can have normal glucose tolerance and body composition. J. Dev. Orig. Health Dis. 2014;5:229–39.

31. Blackmore HL, Niu Y, Fernandez-Twinn DS, Tarry-Adkins JL, Giussani DA, Ozanne SE. Maternal Diet-induced Obesity Programs Cardiovascular Dysfunction in Adult Male Mouse Offspring Independent of Current Body Weight. Endocrinology. 2014;155:3970–80.

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

33. Peleg-Raibstein D, Luca E, Wolfrum C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. Behav. Brain Res. 2012;233:398–404.

34. Rivera HM, Kievit P, Kirigiti MA, Bauman LA, Baquero K, Blundell P, et al. Maternal high-fat diet and obesity impact palatable food intake and dopamine signaling in nonhuman primate offspring. Obes. Silver Spring Md. 2015;23:2157–64.

35. Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. Physiol. Behav. 2006;88:234–43.

36. Wei Y, Yang C-R, Wei Y-P, Ge Z-J, Zhao Z-A, Zhang B, et al. Enriched Environment-induced Maternal Weight Loss Reprograms Metabolic Gene Expression in Mouse Offspring. J. Biol. Chem. 2015;290:4604–19.

DISCUSSION

1) Mise en place d'un modèle murin d'étude des trajectoires pondérales maternelles

1-1) Modèle murin et résultats en période préconceptionnelle

1-1-1) Hypothèses du travail et protocole expérimental

L'objectif de cette thèse était tout d'abord d'évaluer les effets de l'obésité maternelle sur la croissance fœtale au terme de la gestation, ainsi que sur les mécanismes moléculaires associés, et, par la suite, sur l'évolution du phénotype des descendants au cours de leur vie. Je voulais également savoir si la perte de poids en préconception, induite par une intervention nutritionnelle, permettait d'annuler les effets de l'obésité maternelle. Un intérêt particulier a été porté aux mécanismes épigénétiques du conditionnement développemental du syndrome métabolique. Nous avons émis l'hypothèse que les gènes codants les enzymes de la machinerie épigénétique étaient sensibles à l'environnement nutritionnel et métabolique de la mère pendant le développement (Figure 51). Le placenta et le foie fœtal ont été choisis en tant qu'organes cibles des altérations transcriptionnelles, induites par l'obésité et la perte de poids maternelle.

A mon arrivée en thèse, nous avons développé un modèle murin pour étudier les trajectoires pondérales maternelles et leurs effets sur le phénotype de la descendance, à court et à long terme. L'obésité a été induite chez les femelles (groupe OB), grâce à un régime hyperlipidique (HFD), donné 4 mois avant la conception, pendant la gestation et la lactation (Figure 52). Le groupe contrôle (CTRL) a été nourri avec un régime équilibré (CD). Afin de faire maigrir les femelles OB, un retour à un régime CD a été effectué deux mois avant le début de la période de reproduction (groupe WL). Ces régimes ont respectivement été gardés pendant la gestation et la lactation. Dans un premier lot de femelles, les fœtus et leur placenta correspondants ont été prélevés à E18.5. Pour l'étude longitudinale du phénotype, un second lot, respectant exactement le même protocole nutritionnel, a été mis en place. Les gestations ont été poursuivies jusqu'à la naissance des descendants qui ont été suivis pendant toute la lactation et pendant 6 mois après sevrage.

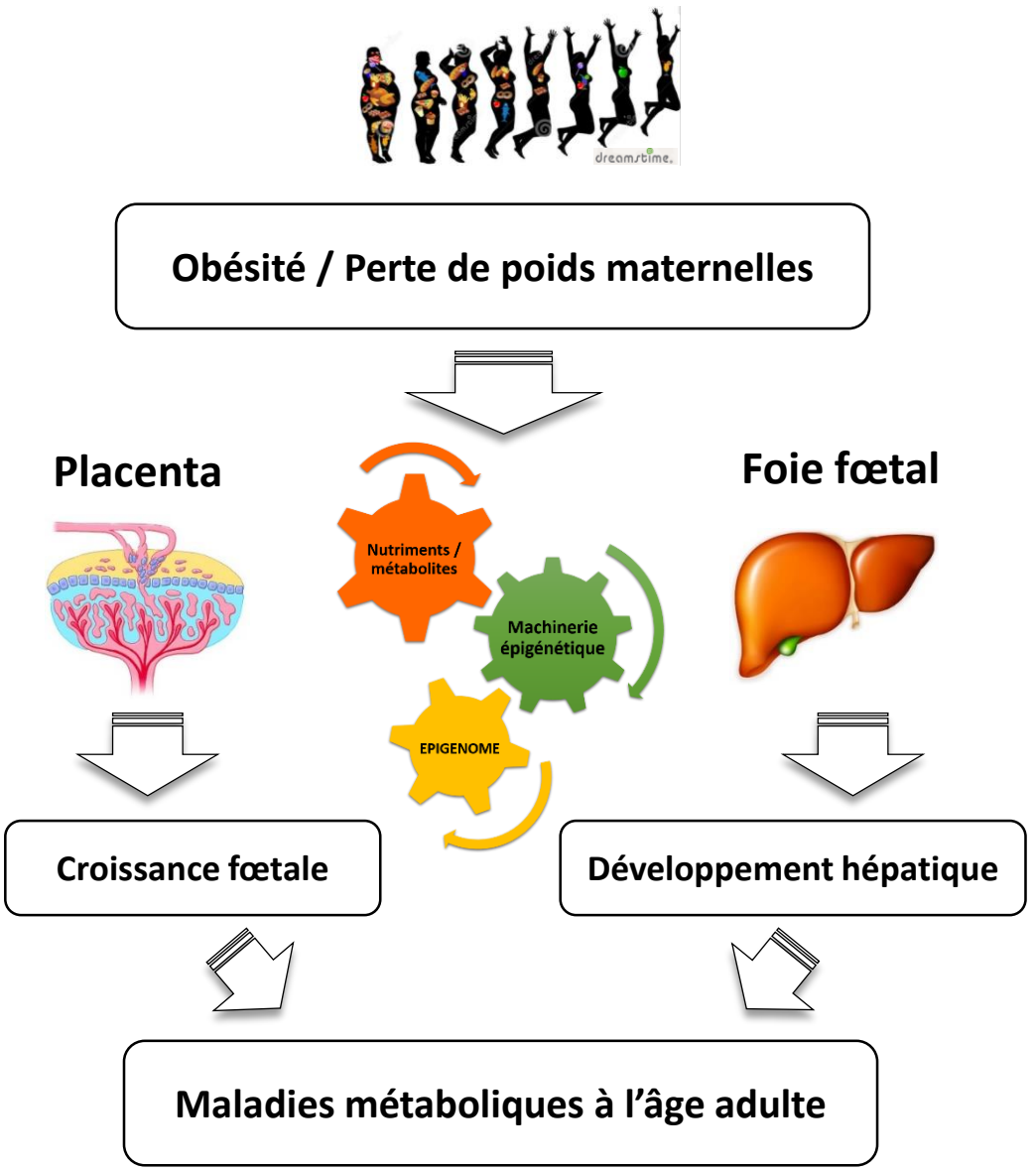


Figure 51. Hypothèse des effets des trajectoires pondérales maternelles sur les organes cibles, avec un impact sur le développement fœtal et une prédisposition aux maladies métaboliques à l'âge adulte

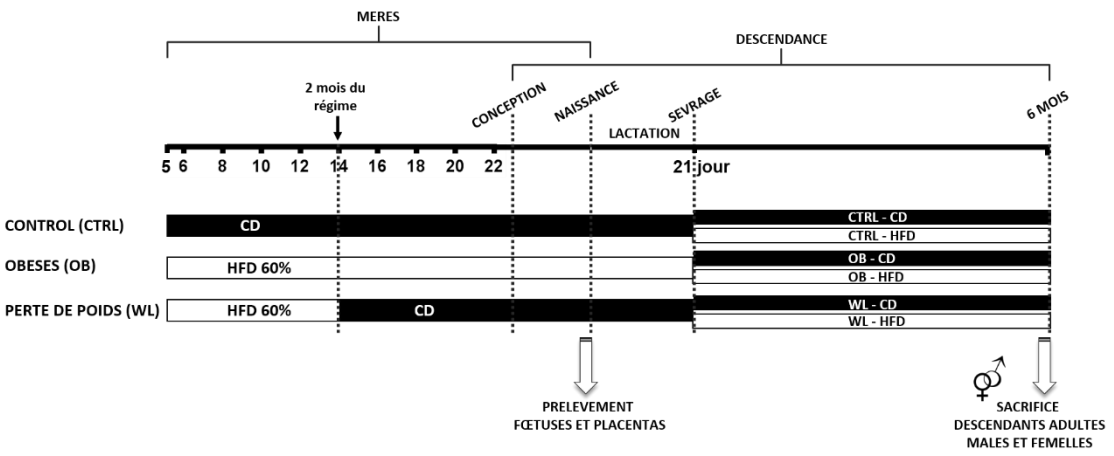


Figure 52. Le modèle des effets des trajectoires pondérales maternelles sur les organes cibles, avec un impact sur le développement fœtal et une prédisposition aux maladies métaboliques à l'âge adulte

1-1-2) Composition du régime hyperlipidique utilisé

Les régimes utilisés dans ce travail sont achetés chez Research Diets. Le régime HFD contient une quantité importante de lipides, 59,9% en termes de calories (Tableau 6). Ces lipides sont principalement des acides gras (AG) saturés (37,1%) et monoinsaturés (46%), issus du saindoux. Ce type de régime est largement utilisé pour les travaux menés dans le domaine de la nutrition et des maladies métaboliques chez les rongeurs (Jones et al., 2009; King et al., 2013b; Platt et al., 2014). Ce régime hyperlipidique est bien distinct des régimes de type "*Western diet*" (ou "cafétéria"), qui ont un apport important de lipides, mais également de glucides, sous forme de saccharose.

Dans notre modèle, le régime HFD a été comparé au régime CD, qui contient 10% de calories provenant de lipides, dont 40,2% des AG polyinsaturés. L'apport protéique pouvant également conditionner le phénotype de la descendance (Lillycrop et al., 2008), la consommation de protéines (calculée par kg de poids de souris) a été équivalente entre les groupes expérimentaux dans notre étude. Le régime CD contient 70% de glucides, principalement issus de l'amidon, et non du saccharose. Ces deux régimes ont pour avantage d'être purifiés, ce qui permet de contrôler la qualité et la composition des nutriments, ainsi que l'apport calorique. Ils présentent également un intérêt particulier pour les études dans le domaine de l'épigénétique, car leur composition en vitamines et minéraux, en termes de calories, est équivalente entre les deux régimes. Ainsi, la nutrition des femelles ne varie pas en termes de cofacteurs et de substrats des enzymes épigénétiques, limitant les biais éventuels de modulation de l'activité de la machinerie épigénétique (voir partie 3 du chapitre II de l'introduction).

1-1-3) Fenêtres critiques d'exposition choisies et phénotype des femelles en période préconceptionnelle

Des périodes critiques concernant l'impact de l'environnement sur le développement de l'individu existent. Les effets à court et long terme peuvent être différents, selon la durée et le moment d'exposition au régime (Gregorio et al., 2010; Plata et al., 2014; Sasson et al., 2015; Shankar et al., 2008). Nous avons exploré l'impact de l'obésité chronique chez la mère, afin de modéliser une situation couramment observée chez l'homme. Dans notre étude, deux mois du

		Régime CD (D12450K)	Régime HFD (D12492)
Protéines	**Total**	**20,0**	**20,0**
	Caséine	19,7	19,7
	L-Cystine	0,3	0,3
Glucides	**Total**	**70,0**	**20,1**
	Amidon	54,2	0
	Maltodextrines 10	14,8	12,3
	Saccharose	0	6,8
	Cellulose, BW200	0	0
Lipides	**Total**	**10,0**	**59,9**
	Huile de soja	5,6	5,6
	Saindoux (lard)	4,4	54,3
Composition détaillée en acides gras (AG)	***AG saturés***	***25,1***	***37,1***
	dont		
	Acide caprique C10	*0,0*	*0,1*
	Acide laurique C12	*0,0*	*0,3*
	Acide myristique C14	*2,0*	*3,5*
	Acide pentadécyclique C15	*0,0*	*0,3*
	Acide palmitique C16	*65,7*	*61,3*
	Acide margarique C17	*1*	*1,0*
	Acide stéarique C18	*31,3*	*33,0*
	Acide arachidonique C20	*0,0*	*0,5*
	AG monoinsaturés	***34,7***	***46,0***
	dont		
	Acide palmitoléique C16:1	*2,3*	*3,8*
	Acide oléique C18:1	*96,9*	*94,6*
	Acide gadoléique C20:1	*0,8*	*1,6*
	AG polyinsaturés	***40,2***	***16,9***
	dont		
	Acide linoléique C12:2, n-6	*88,0*	*89,5*
	Acide linolénique C18:3, n-3	*10,5*	*6,5*
	Acide gras C20:2	*1,0*	*2,5*
	Acide dihomo-y-linolénique C20:3, n-6	*0,0*	*0,4*
	Acide arachidonique C20:4, n-6	*0,5*	*0,9*
	Acide docosapentaénoïque C22:5, n-5	*0,0*	*0,2*
Minéraux	**Total**	**0**	**0**
	Mix de minéraux S10026	10g / 4057kcal	10g / 4057kcal
	Phosphate dicalcique	13g / 4057kcal	13g / 4057kcal
	Carbonate de calcium	5,5g / 4057kcal	5,5g / 4057kcal
	Citrate de Potassium	16,5g / 4057kcal	16,5g / 4057kcal
Vitamines	**Total**	**1**	**1**
	Mix de vitamines V10001	10g / 4057kcal	10g / 4057kcal
	Bitartrate de choline	2g / 4057kcal	2g / 4057kcal
Colorant		FD&C Red Dye #40, Blue Dye #1	FD&C Blue Dye #1
Kcal/g ingéré		**3,85**	**5,24**

Tableau 6. Composition des régimes contrôle (CD) et hyperlipidique (HFD) en % de calories totales. La composition en lipides est indiquée en % calorique du sous-total des acides gras

régime HFD ont induit une augmentation de poids, une hyperglycémie, une intolérance au glucose et une hypercholestérolémie. Avant la conception, des femelles du groupe OB présentaient le phénotype de l'obésité sévère. Concernant les interventions nutritionnelles en période préconceptionnelle, les fenêtres critiques de réintroduction du régime équilibré ne sont encore connues, ni chez l'homme, ni chez la souris (Forsum et al., 2013) (Tableau I, Annexes). Chez le rat, 1 mois de régime CD avant la gestation permet une perte de poids de la mère, ainsi que l'amélioration de certains paramètres métaboliques chez la descendance adulte (Zambrano et al., 2010). Dans notre modèle murin, nous avons ainsi choisi de remplacer le régime HFD par le CD 2 mois avant la conception : des données préliminaires montraient que cette durée permettait d'améliorer le poids et le métabolisme des souris C57BL/6J (Junien et coll., non-publié). Les femelles du groupe WL de notre modèle ont en effet perdu du poids et normalisé leurs paramètres métaboliques au cours de ces deux mois de régime CD. De manière intéressante, au début de la période de reproduction, et pour les paramètres étudiés, le phénotype des femelles WL est très similaire aux souris CTRL, bien qu'elles gardent un léger surpoids significatif de 5%.

1-2) Limites du modèle

Au cours de l'intervention nutritionnelle, la perte de poids des femelles WL a été rapide et massive. Cela peut s'expliquer par la néophobie alimentaire que nous avons observée : les souris diminuent drastiquement leur prise alimentaire au cours de la première semaine après changement du régime, qui semble moins appétant, puis mettent 3 semaines pour la normaliser complètement. Ce changement radical d'alimentation a vraisemblablement provoqué un stress chez ces femelles. Ces facteurs sont à prendre en compte dans la réponse métabolique complexe associée à une perte du poids (Greenway, 2015).

Chez l'homme, une perte de poids s'étale sur de longues périodes, variables selon les individus et dépendantes de nombreux paramètres. Les mécanismes de régulation du comportement alimentaire, dans le contexte de l'obésité et du régime alimentaire, peuvent varier entre ces deux espèces. Ainsi, une comparaison de données obtenues sur notre modèle murin avec celles des patientes obèses, essayant de suivre les recommandations préconceptionnelles, doit se faire avec prudence.

	Lignée de souris	Régime	Période d'application	Stade	Effet sur le poids fœtal	Mécanismes	Référence
Restriction de croissance foetale	C57BL/6	HFD (30%) + HS (36%)	GEST	E16 E19	-10% (E16), normalisé (E19)	↑ transport du glucose et des acides aminés; ↑ expression des gènes soumis à empreinte dans le **placenta**	(Sferruzzi-Perri et al., 2013)
	C57BL/6J, CF-1	HFD (60%)	PREC, GEST	E12.5 E17.5	↓ poids (E12.5, E17.5)	Transcriptome **placentaire** altéré: gènes impliqués dans la vascularisation, l'inflammation, métabolisme lipidique...	(Sasson et al., 2015)
	CD1	HFD (36%)	PREC, GEST	E18.5	-11%	Expression altérée des facteurs de croissance et des gènes impliqués dans la production du glucose, l'inflammation et le stress oxydatif dans le **foie fœtal**	(Plata et al., 2014)
	ICR	HFD (36%)	PREC, GEST	E14.5	↓ poids + plus petits	Anomalies du développement **cérébral**	(Luzzo et al., 2012)
	C57BL/6J	HFD (36%)	PREC, GEST	E14.5	↓ poids + plus petits	↓ IGF1r dans le **placenta**	(Jungheim et al., 2010)
	C57BL/6J	HFD (60%)	PREC, GEST	E14.5 E18.5	-8% (E18.5, mâles)	↑ transport des acides aminés dans le **labyrinthe placentaire** (uniquement à E14.5)	(King et al., 2013)
Poids fœtal élevé	C57BL/6J	HFD (41%) + solution de sucrose (20%)	PREC, GEST	E18.5	+18%	↑ transport du glucose et des acides aminés dans le **placenta**	(Rosario et al., 2015)
	C57BL/6J	HFD (32%)	PREC, GEST	E18.5	+43%	↑ transport du glucose et des acides aminés dans le **placenta**	(Jones et al., 2009)
	C57BL/6J	HFD (41%) + solution de sucrose (20%)	PREC, GEST	E18.5	+29%	↑ transport du glucose et des acides aminés dans le **placenta**, ↑ voie mTORC1 et insuline, ↓ expression de *Pparα*	(Aye et al., 2015)

Tableau 7. Effets du régime hyperlipidique (HFD) chez la mère sur le poids fœtal chez la souris

PREC – préconception, GEST – gestation, E – jour embryonnaire

2) Effets à court terme

2-1) Résultats

2-1-1) Obésité maternelle : restriction de croissance fœtale

Au terme de la gestation, la première observation que nous avons faite concerne une restriction de croissance chez les fœtus des mères obèses, de 13% par rapport aux souris CTRL. La proportion de fœtus "petits pour l'âge gestationnel" (SGA), c'est-à-dire ayant un poids inférieur au 10ème percentile de la population contrôle, a atteint un tiers des individus. Cette réduction du poids fœtal, comparable au retard de croissance intra-utérin chez l'homme, a été associée à une efficacité placentaire réduite. D'autres études ont également observé une restriction de croissance fœtale chez les souris obèses (Hartil et al., 2009; Jungheim et al., 2010; Luzzo et al., 2012; Plata et al., 2014; Sasson et al., 2015; Sferruzzi-Perri et al., 2013). Cependant, l'obésité maternnelle peut conduire à une macrosomie fœtale chez la souris, qui est associée à une augmentation du transport du glucose et des acides aminés dans le placenta (Aye et al., 2015; Jones et al., 2009; Rosario et al., 2015). Au vu de ces études, utilisant de nombreux protocoles (période d'exposition, composition du régime) et différents lignées murins, aucun tableau clair ne se dessine. Il est donc difficile de tirer des conclusions générales sur les mécanismes liant nutrition maternelle obésogène et croissance fœtale (Tableau 7).

2-1-2) Perte de poids préconceptionnelle : restauration partielle de la croissance fœtale

Nous avons cherché à savoir si, malgré l'absence de différence phénotypique apparente entre les mères qui ont perdu le poids et les mères CTRL, le phénotype de la descendance présentait des altérations au terme de la gestation. En effet, le poids des fœtus était significativement réduit par rapport aux fœtus CTRL, mais la différence était plus faible (-5% du poids moyen). De manière intéressante, la proportion de fœtus SGA était complètement normalisée chez les femelles WL. L'efficacité placentaire était complètement restaurée chez les femelles WL. Ainsi, selon ces résultats, l'intervention nutritionnelle avant le début de la gestation a eu un effet bénéfique sur la croissance fœtale. Il serait intéressant d'étudier si une perte de poids grâce à un régime équilibré sur une plus longue période pourrait restaurer complètement le poids fœtal.

2-1-3) Altérations transcriptionnelles dans le placenta et le foie fœtal induites par l'obésité et la perte de poids maternelle

Grâce à notre modèle, nous avons pu étudier l'impact de l'obésité et de la perte de poids maternelles sur l'expression génique dans le placenta et le foie fœtal. Vingt trois gènes ont été différentiellement exprimés entre au moins deux groupes maternelles.

De manière intéressante, nous avons observé une réponse transcriptionnelle dans le foie fœtal et dans le labyrinthe placentaire, mais une absence de changements d'expression génique dans la zone jonctionnelle. Ce phénomène pourrait être lié aux fonctions distinctes de ces deux zones placentaires : le labyrinthe est une zone d'échanges entre le sang maternel et fœtal, tandis que la zone jonctionnelle permet l'ancrage du placenta dans la décidue et la sécrétion hormonale, nécessaires pour le maintien de la gestation (Hu and Cross, 2010). Le labyrinthe semble répondre plus fortement à l'environnement maternel. Du fait de la dynamique des échanges fœto-maternels dans cette zone, une réponse rapide aux facteurs délétères serait nécessaire.

Réponse transcriptionnelle de la machinerie épigénétique. Notre étude a révélé une dérégulation des gènes impliqués dans les processus épigénétiques, en réponse aux trajectoires pondérales maternelles, à E18.5 dans le labyrinthe et le foie fœtal. Dans les 3 tissus, 18 de 60 gènes de la machinerie épigénétique étudiés étaient différentiellement exprimés entre les groupes OB, WL et CTRL. A ce jour, peu d'études s'intéressent à la dérégulation de la machinerie épigénétique dans le contexte de maladies métaboliques. Les travaux se focalisent plus particulièrement sur les modifications de l'épigénome, dans le contexte de la surnutrition ou sous-nutrition maternelle et du concept de DOHaD (Tableau V, Annexes). A notre connaissance, notre étude est la première à explorer le rôle des gènes codants pour les enzymes épigénétiques dans le conditionnement développemental par l'obésité et la perte de poids. Dans une autre étude, chez le rat, le régime maternel carencé en protéines provoque une restriction de croissance fœtale, associée à une dérégulation du transcriptome dans plusieurs organes fœtaux et le placenta (Vaiman et al., 2011). De manière intéressante, l'expression de gènes de la machinerie épigénétique était altérée de manière significative dans le placenta. Nous ne pouvons pas comparer nos résultats avec cette étude, mais l'ensemble de ces données donne une indication sur la sensibilité particulière des régulateurs épigénétiques à l'environnement métabolique maternel.

Machinerie de l'acétylation des histones. De manière frappante, la majorité des gènes avec une expression différentielle est impliquée dans l'acétylation des histones. Nous avons

étudié 9 gènes codants pour les KATs, 18 gènes codants pour les HDACs et 2 gènes codants pour des BRDs, ce qui représente la moitié des gènes de la machinerie épigénétique pris en compte dans notre étude (60). Nous avons observé qu'une proportion élevée de gènes différentiellement exprimés est impliquée dans l'acétylation : 78% dans le foie, 75% dans le labyrinthe et un seul gène altéré dans la zone jonctionnelle. Plus particulièrement, l'équilibre balance entre les "*writers*" et "*erasers*" de l'acétylation est altérée. Dans le foie et le labyrinthe, l'expression des KATs était augmentée et celle des HDACs diminuée en cas d'obésité maternelle (à l'exception de *Hdac6*, dont l'expression était augmentée). Le niveau de Brd2, "*reader*" de l'acétylation des histones, qui contribue à l'activation transcriptionnelle, était également augmenté par l'obésité maternelle. Quant à la perte de poids maternelle, celle-ci a permis de normaliser l'expression seulement d'une partie de ces gènes. Ainsi, une adaptation physiologique à l'environnement maternel est observée, en termes d'expression génique, dans le labyrinthe et le foie fœtal. Ces résultats sont intéressants car la machinerie d'acétylation des histones est étroitement liée aux processus métaboliques de la cellule (Donohoe and Bultman, 2012) (Tableau II, Annexes).

Selon ces résultats, nous supposons qu'une augmentation du niveau de l'acétylation pourrait avoir lieu dans le groupe OB. De manière intéressante, le niveau total des marques d'acétylation, H3K14ac et H3K18ac, est augmenté dans le foie fœtal, suite à un régime hyperlipidique maternel, dans des modèles de macaques et de rats (Aagaard-Tillery et al., 2008; Strakovsky et al., 2011; Suter et al., 2012). Ce phénomène est en accord avec une réduction de l'expression et de l'activité enzymatique de HDAC1 et SIRT1. Aussi, dans notre modèle, une altération de l'acétylation des histones, en réponse à l'environnement métabolique de la mère, pourrait également se produire et conduire à des altérations du transcriptome des descendants, et ainsi à une construction du phénotype. Notre étude apporte des preuves du rôle potentiel des régulateurs de l'acétylation dans ces processus, ouvrant ainsi de nouvelles pistes pour la compréhension des mécanismes de conditionnement développemental.

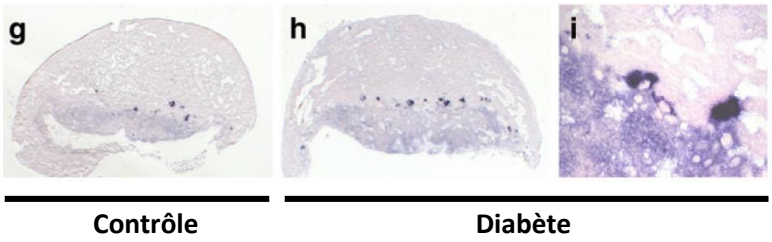


Figure 53. Augmentation de l'expression du transporteur de sérotonine (*Slc6a4*) dans les placentas des souris diabétiques à E10.5

Détermination de la localisation cellulaire de l'expression du gène *Slc6a4* par hybridation *in situ* dans les placentas des femelles contrôles (g) et des femelles rendues diabétiques suite à des injections de streptozotocine (h). Un agrandissement est montré dans les placentas diabétiques (i).

Salbaum et al. 2011

2-2) Limites de notre étude sur les effets à court terme

2-2-1) Approche utilisée

Pour répondre à la question des effets des trajectoires pondérales maternelles sur l'expression génique, nous avons opté pour une approche ciblée, et non une analyse transcriptomique. La technique des cartes microfluidiques RT-PCRq nous a permis d'étudier l'expression de 96 gènes par échantillon simultanément. Pour notre analyse, 60 gènes de la machinerie épigénétique ont été choisis, selon la question suivante : quels gènes de la machinerie peuvent être affectés par l'obésité maternelle dans notre modèle nutritionnel ? J'ai sélectionné, par une analyse bibliographique, des gènes dont l'implication dans les pathologies métaboliques était déjà connue dans la littérature. Certaines familles de gènes n'ont pas été exploitées dans notre étude (SWI/SNF, membres des complexes Polycomb et Tritorax...), car à notre connaissance, ces facteurs n'ont jamais été étudiés dans le contexte de l'obésité. Néanmoins, il n'est pas totalement exclu qu'elles puissent être affectées par l'obésité ou la perte de poids maternelle.

2-2-2) Hétérogénéité cellulaire dans les organes cibles

Les marques épigénétiques sont spécifiques du type cellulaire. Nous avons effectué notre étude sur le foie fœtal et sur le placenta, deux organes à l'organisation cellulaire très complexe. Sur le plan technique, les analyses de marques épigénétiques ou d'expression génique dans les populations cellulaires distinctes *in vivo* chez la souris sont difficiles à réaliser. La mise en place de protocoles permettant le tri des cellules, pour par exemple extraire les cellules du trophoblaste ou des hépatocytes, s'avère nécessaire. Dans notre analyse, nous avons séparément étudié deux zones placentaires, et avons effectivement observé des différences de réponse transcriptionnelle entre le labyrinthe et la zone jonctionnelle. Pour savoir dans quels types cellulaires ces altérations ont lieu, je proposerais de localiser l'expression des gènes de la machinerie de l'acétylation des histones, qui ont montré une expression différentielle importante dans le labyrinthe, sur les coupes du placenta. Pour cela, nous pourrions utiliser la technique d'hybridation *in situ* (Salbaum et al., 2011). Un exemple d'expression accrue du gène codant pour le transporteur de sérotonine, *Slc6a4*, dans le placenta des souris diabétiques à E10.5, est présenté sur la Figure 53.

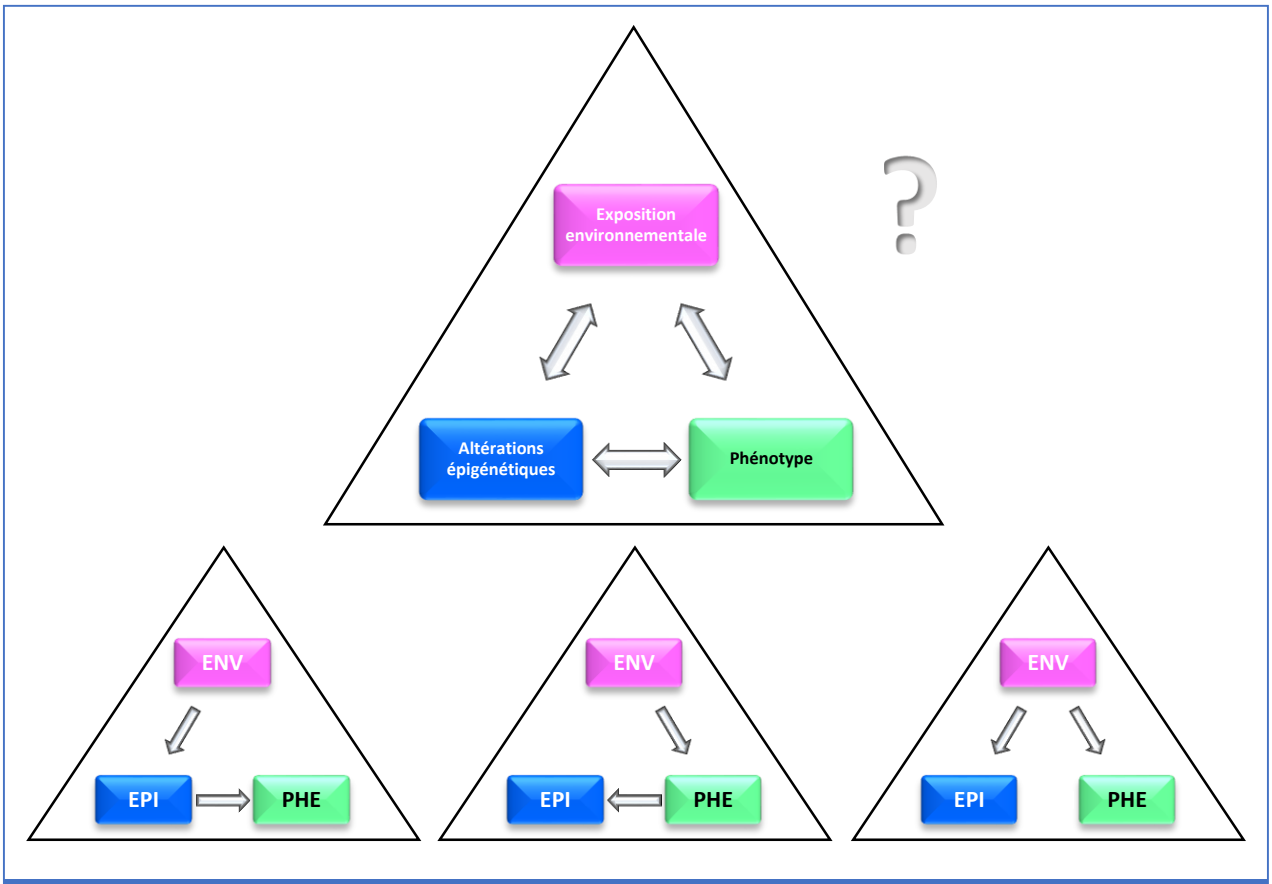


Figure 54. Relations de causes à effets possibles entre l'exposition environnementale, des altérations épigénétiques et le phénotype

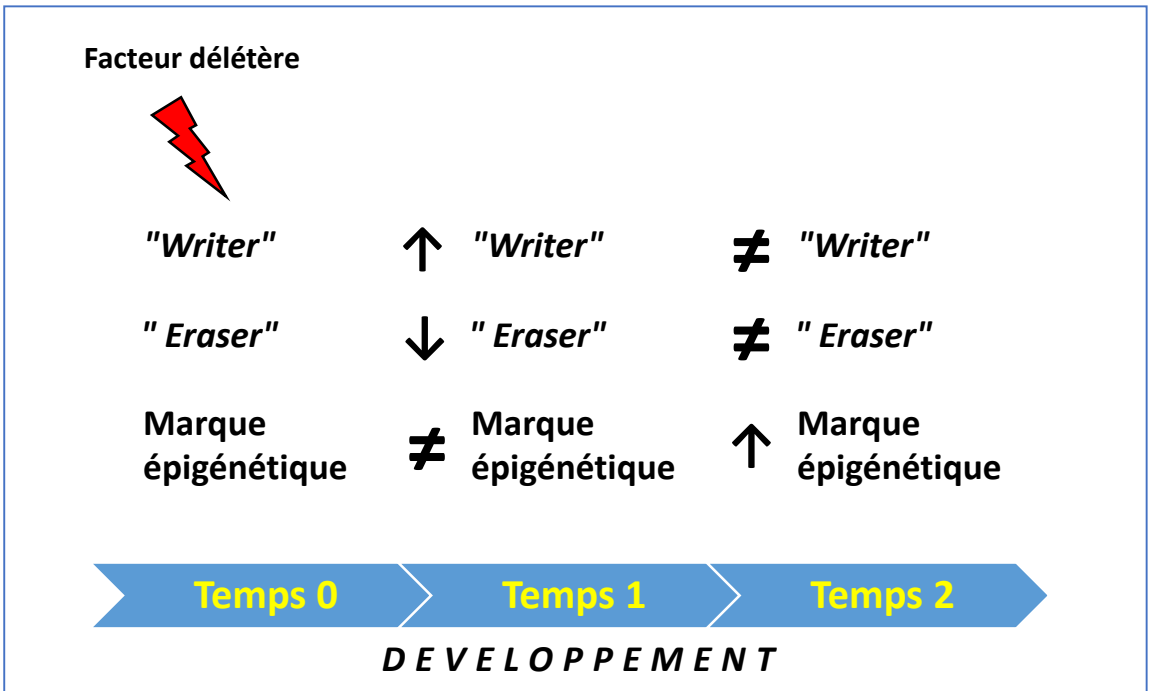


Figure 55. Cinétique possible de régulation de la machinerie épigénétique et sa marque cible dans le temps, suite à un facteur environnemental délétère

2-3) Perspectives

2-3-1) Rôle de l'acétylation des histones dans le contexte de l'obésité et la perte de poids maternelle

Les travaux de cette thèse ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes moléculaires de la restriction de croissance induite par l'obésité maternelle. Nous avons observé une diminution de l'expression de certaines HDACs dans le contexte de l'obésité maternelle. Pour poursuivre ce travail, l'activité enzymatique globale des désacétylases des histones devra être mesurée dans le foie fœtal et le placenta, afin de confirmer l'activité réduite de ces "*erasers*" de l'acétylation des histones. Des perturbations de la balance entre des "*writers*" et des "*erasers*", révélée par notre étude, pourrait conduire à un niveau augmenté d'acétylation des histones dans le foie fœtal et dans le placenta. Il est possible de mesurer le niveau total d'acétylation des histones grâce à la technique de western blot. Cette approche étant peu quantitative, je proposerais d'utiliser des kits de type "*multiplex*". Ces kits permettent d'évaluer un grand nombre de marques différentes à la fois, en utilisant des anticorps spécifiques et une approche colométrique. Ensuite, il me paraît important de cartographier, sur l'ensemble du génome, les séquences et gènes cibles des marques d'acétylation, qui sont sensibles au métabolisme maternel. Pour cela, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), suivie d'un séquençage massif, serait à entreprendre. Cela permettrait d'établir un lien entre la marque épigénétique altérée par l'obésité, ou la perte de poids maternelle, et des réseaux de gènes affectés et des fonctions biologiques impliquées.

2-3-2) Lien de cause à effet : marques épigénétiques et restriction de croissance

Comme je l'ai souligné dans les conclusions du chapitre II, des études cinétiques seraient nécessaires afin d'établir le lien de causalité entre l'exposition à un environnement maternel, les marques épigénétiques et le début d'une pathologie (Figure 54, 55). Pour cela je proposerais de mesurer une marque d'acétylation pertinente au début (E12.5) et au milieu (E15.5) de la période fœtale, bien avant E18.5, lorsqu'une restriction de croissance a été observée. De plus, il serait judicieux de mesurer l'expression et l'activité de la machinerie épigénétique, qui régule cette marque, aux mêmes stades, afin de compléter les travaux de cette thèse. En mesurant le poids fœtal et placentaire en parallèle, nous pourrions identifier le stade auquel débute la

perturbation de la croissance. Cela permettrait de définir la période exacte de l'initiation de la pathologie et de dérégulation épigénétique, ainsi que de répondre à la question suivante : la marque épigénétique est-elle à l'origine d'une restriction de croissance fœtale ?

2-3-3) Altérations morphologiques et fonctionnelles du foie fœtal et du placenta

Pour comprendre comment l'obésité maternelle affecte les fonctions placentaires et hépatiques chez le fœtus, certaines études histologiques pourraient être faites. Tout d'abord, la structure et la surface totale de chacune des zones placentaires pourraient être évaluées. Puis, l'accumulation des lipides, aux différents stades du développement, pourrait être visualisée grâce à une microscopie optique ou électronique. Une méthode de coloration à l'huile rouge (O-Red-O) pourrait évaluer une éventuelle accumulation des lipides dans le foie fœtal (Díaz et al., 2015). Un autre moyen d'évaluer l'impact de la nutrition maternelle sur le métabolisme lipidique, dans le placenta et le foie serait de mesurer le niveau total des triglycérides et du cholestérol dans ces organes chez les mères OB et WL. Il est possible de mesurer le taux total de ces lipides en effectuant une extraction selon la méthode de Folch, (mélange chloroforme et méthanol), puis un dosage par chromatographie gaz-liquide (Folch et al., 1957; McCurdy et al., 2009; Tarrade et al., 2013).

Nous avons observé une expression réduite de la *glucokinase* dans le foie des fœtus des mères obèses à terme de gestation. La glucokinase catalyse la réaction de phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate et contrôle ainsi le métabolisme glucidique (Oosterveer and Schoonjans, 2014). Les conséquences fonctionnelles de la réduction de l'expression de ce gène restent à déterminer. La quantité protéique de glucokinase pourrait être mesurée par western blot. Le niveau de glucose plasmatique, ainsi que les réserves hépatiques de glycogène des fœtus des mères obèses, pourraient être altérés.

L'expression de *Clock,* acteur principal de la machinerie des rythmes circadiens, est élevée dans le foie fœtal en cas d'exposition à l'obésité maternelle. Le fœtus présente déjà une rythmicité circadienne dans l'expression des gènes (Serón-Ferré et al., 2012). Les rythmes circadiens hépatiques pourraient ainsi être affectés au terme de la gestation (Suter et al., 2011). Il a en effet été montré que l'obésité maternelle et l'exposition au HFD *in utero* peuvent entrainer une perturbation des rythmes circadiens de la descendance, ce qui participe au conditionnement aux troubles métaboliques (Borengasser et al., 2014a). La mesure de l'expression hépatique de

Bmal1, *Per* et *Cry* serait envisageable plusieurs fois dans la journée à E18.5, selon le protocole développé par Wharfe et coll chez le rat (Wharfe et al., 2011). Cela permettrait de savoir si l'obésité maternelle entraine une dérégulation de l'horloge (rythmicité, amplitude des cycles…) dans notre modèle, et ce déjà au stade fœtal, et si la perte de poids permet de restaurer ces cycles.

2-3-2) Transposition à la pathologie humaine

Grâce aux connaissances obtenues dans ce modèle murin, les mécanismes induits par les trajectoires pondérales maternelles pourraient être transposées à l'homme. Organe disponible pour les analyses, après la naissance, le placenta est un témoin de l'exposition du fœtus à l'environnement, au cours de son développement *in utero*. Les mêmes marques d'acétylation pourraient être altérées, suite à l'obésité ou à des changements de l'IMC de la mère. Actuellement, de plus en plus d'études montrent des altérations de la méthylation de l'ADN dans cet organe, suite aux pathologies et expositions à divers facteurs (Finer et al., 2015; Nelissen et al., 2011; Nomura et al., 2014; Ruchat et al., 2013). Compte tenu de l'importance des modifications des histones au cours du développement, des études dans cette direction pourraient davantage nous éclairer sur le rôle des mécanismes épigénétiques, dans des pathologies telles que le retard de croissance intra-utérin.

Pour conclure, notre étude sur les effets de l'environnement au terme de la gestation ouvre de nouvelles perspectives sur le rôle de la machinerie épigénétique dans la réponse du fœtus et du placenta à l'environnement maternel. De nombreux questionnements sur la dynamique de ces processus, les conséquences sur le fonctionnement des organes à court et à long terme, le lien de causalité entre l'épigénome et une restriction de croissance persistent et nécessitent des recherches complémentaires dans ce modèle.

3) Effets à long terme

3-1) Résultats

La restriction de croissance fœtale est un marqueur de prédisposition aux pathologies métaboliques à l'âge adulte (Dessì et al., 2012; Fernandez-Twinn and Ozanne, 2006; Hales et al., 1991). Au cours de cette thèse, j'ai cherché à établir le lien entre obésité maternelle, restriction de croissance et prédisposition à développer des pathologies métaboliques après la naissance ou plus tard, à l'âge adulte. Pour cela, nous avons effectué un suivi longitudinal de la descendance, de la naissance jusqu'à l'âge de 6 mois.

3-1-1) Effets de l'obésité maternelle sur le phénotype de la descendance avant le sevrage

Tout d'abord, nous avons observé un effet de l'obésité maternelle pendant la période de lactation : le poids des souriceaux était significativement plus élevé du 7ème jour post-natal jusqu'au sevrage ; alors, qu'ils présentaient un poids moyen réduit de 13% au terme de la gestation. Il semble donc que les souriceaux aient effectué un rattrapage ou "*catch-up growth*" au cours de la première semaine de vie. Ce phénomène pourrait être dû, d'une part, au conditionnement par l'environnement prénatal ou, d'autre part, aux effets propres de la lactation. Cependant, notre protocole ne permet pas de répondre à la question des fenêtres critiques de l'impact de l'obésité sur le poids de la descendance. Il pourrait également s'agir d'un artéfact, dû à la perte importante de souriceaux dans le groupe obèse au cours de la première semaine de vie. La réduction du nombre de souriceaux après la naissance observée pour les mères obèses, suggère que seuls ceux ayant un poids suffisant, probablement les plus robustes, auraient pu survivre, biaisant ainsi les données de poids. Cet aspect sera discuté dans la partie 4 de la discussion.

3-1-2) Effets de l'obésité maternelle sur le phénotype de la descendance à l'âge adulte

Plusieurs paramètres ont été mesurés après le sevrage et jusqu'à l'âge de 6 mois : poids corporel, prise alimentaire, tolérance au glucose, glycémie, insulinémie et cholestérolémie à jeun, ainsi que poids des organes au sacrifice. De nombreuses études font le lien entre

surnutrition ou obésité maternelle et phénotype de la descendance adulte (Li et al., 2011; Williams et al., 2014). Les effets à long terme peuvent être subtils et révélés uniquement par l'environnement obésogène. Selon notre hypothèse, le régime HFD appliqué après le sevrage révèlerait une prédisposition au syndrome métabolique. Nous avons observé un effet de l'obésité maternelle sur la prise de poids des descendants mâles qui ont été placés sous régime HFD. Leur vitesse de prise de poids était significativement plus elevée par rapport aux descendants des mères contrôles. Nous n'avons pas observé d'autres effets de l'obésité maternelle sur le phénotype métabolique de la descendance. Nous pouvons conclure que l'effet du régime HFD post-natal s'avère plus important que celui de l'environnement maternel.

Depuis que nous avons commencé nos travaux, plusieurs études ont également montré une absence, ou de très faibles effets, de l'obésité maternelle sur plusieurs paramètres de la descendance (poids corporel, les taux de glucose, insuline, TG, tolérance au glucose, composition corporelle…) (King et al., 2013a; King et al., 2014; Platt et al., 2014). Différents types de régime hyperlipidique (dont celui utilisé dans notre étude), contenant des AG issus du lard ou du beurre, donnés aux souris de la souche ICR, n'altèrent pas le phénotype de la descendance (Platt et al., 2014). Chez les souris C57BL/6J, les effets étaient très peu marqués chez les descendants de la 1ère génération, le conditionnement du phénotype métabolique étant cependant observé dans la 2ème génération (King et al., 2013a). Les discordances observées dans la littérature sur ce sujet pourraient être expliquées par la diversité des protocoles expérimentaux. Les comparaisons et reproductibilité de travaux dans ce domaine reste difficile : le régime (HFD / *Western diet*), l'espèce et la souche, la période d'exposition, ainsi que la saison lors de laquelle l'expérience est effectuée, peuvent avoir un effet différent sur la descendance et constituer des facteurs confondants.

3-1-3) Effets de la perte de poids préconceptionnelle maternelle sur le phénotype de la descendance

Avant le sevrage, le poids des souriceaux nés des mères WL était normalisé. Après le sevrage et jusqu'à l'âge de 6 mois, les descendants des mères WL étaient indistinguables des descendants des mères CTRL, et ce aussi bien sous régime CD que dans un environnement obésogène (HFD). Les descendants des souris, ayant perdu du poids et normalisé leurs paramètres métaboliques avant la conception, ne présentaient pas d'altérations négatives du poids corporel, de la composition corporelle, de la prise alimentaire, du métabolisme lipidique

et glucidique. Nous avons ainsi démontré des effets bénéfiques à long terme de l'intervention nutritionnelle, en amont de la conception, sur le phénotype de la descendance.

Chez la souris, cette étude est la première à s'intéresser aux effets de la perte de poids, suite à une intervention nutritionnelle en période préconceptionnelle, sur la santé de la descendance adulte. Seuls deux modèles animaux examinent cette question dans la littérature, chez le rongeur (rat) et le mouton (Tableau I, Annexes) (Srinivasan, 2005; Zambrano et al., 2010). Pourtant, cette question biologique a son importance pour la santé des enfants des femmes obèses, qui perdent du poids avant de concevoir, en suivant les recommandations actuelles. Notre étude permet de donner une première indication positive, car nous n'avons pas détecté de problèmes métaboliques chez les descendants après la naissance et à l'âge adulte.

3-2) Limites de notre étude sur les effets à long terme

3-2-1) Effets de la lactation sur le phénotype des descendants

Dans notre étude, les mères ont conservé leurs régimes respectifs après la mise bas. Ainsi, les descendants des mères OB pouvaient recevoir, via le lait maternel, un excès de lipides, d'hormones (leptine, adiponectine, ghréline, insuline, glucocorticoïdes…), ou d'autres facteurs (miARN, immunoglobulines…) (Çatlı et al., 2014; Power and Schulkin, 2013). Une modification de la composition du lait des mères obèses, contribuerait ainsi à l'augmentation du poids des souriceaux, au cours de la période de la lactation. Chez les rattes sous régime HFD, le lait est plus riche en calories et contient plus de lipides ; le temps d'allaitement est prolongé (Purcell et al., 2011). De plus, le comportement alimentaire de leurs ratons est altéré : ils consomment plus de lait au cours d'un test individuel avec apport de lait *ad libitum*. Afin de séparer les effets de l'environnement *in utero* des effets de la lactation, mettre en place un protocole d'adoptions croisées des portées pourrait être envisagé (Masuyama and Hiramatsu, 2014; Ozanne and Hales, 2004).

3-2-2) Puissance statistique de l'étude à long terme

Dans notre étude du phénotype de la descendance à l'âge adulte, nous avons pu obtenir un nombre d'animaux de 10 à 20, par groupe maternel, sexe et régime post-sevrage. Nous n'avons pas observé de différence significative pour les paramètres étudiés entre les descendants des mères OB et CTRL, chez les mâles et les femelles. Chez les mâles, nés des mères obèses, et qui sont eux-mêmes sous régime HFD après le sevrage, nous avons détecté

une tendance à l'aggravation de l'obésité par rapport aux descendants des mères contrôles. Nous avons calculé la puissance statistique : elle est comprise entre 14 et 65% pour chaque point de mesure du poids corporel, soit inférieure aux 80% requis pour l'interprétation de la p-value. Pour atteindre 80% de puissance statistique, le nombre de descendants requis est de 45. Pour obtenir cet effectif, compte tenu du faible taux de survie observe au cours de nos travauxtre, il faudrait 324 mères dans le groupe OB et 106 mères CTRL. Un tel protocole expérimental est difficilement envisageable. Il serait préférable d'évaluer si une autre souche de souris serait plus adaptée.

3-2-3) Mortalité néonatale et lien avec comportement maternel et mise en place de la lactation

La souche C57BL/6J se caractérise par une importante mortalité à la naissance, plus particulièrement chez les femelles primipares, ce qui serait lié à un comportement maternel non-prononcé et par l'abandon de la portée (Weber et al., 2013). Dans notre modèle, nous avons en effet observé une mortalité importante de nouveau-nés (au cours de la 1ère semaine après la naissance) dans tous les groupes. Cependant, le taux de survie différait selon les groupes : 48% de portées (composé d'au moins 1 souriceau vivant au sevrage) ont été sevrés pour les mères contrôles, tandis que seulement 24% de portées l'ont été pour les mères obèses. Ainsi, seulement un quart des portées survivent au-delà de la première semaine de vie. Dans le groupe WL, la survie néonatale est, quant à elle, considérablement améliorée (67% de portées sevrées), même par rapport aux souris CTRL.

Cette mortalité importante chez des nouveau-nés des mères obèses pourrait s'expliquer par des problèmes de mise en place de la lactation. Une étude approfondie des effets de l'obésité sur le développement de la glande mammaire, ainsi qu'une vérification du contenu de l'estomac des souriceaux décédés devraient être menées. Une autre explication possible serait une modification du comportement maternel chez ces femelles obèses. Chez les souris C57BL/6J, le régime HFD agirait en tant que facteur de stress, perturbant le comportement maternel et (Bellisario et al., 2015). Cela pourrait expliquer par conséquent, un risque plus élevé de cannibalisme et de comportement agressif chez les mères obèses, envers un facteur de stress, qui reste inconnu dans notre protocole. Dans notre étude, il était difficile de savoir si le cannibalisme a contribué à la mortalité néonatale. Néanmoins, nous avons observé qu'une partie des souriceaux morts étaient intacts dans la sciure à bonne distance du nid, contredisant cette hypothèse. Mais une autre partie des petits étaient mangée par la mère. Il serait intéressant

de filmer le comportement maternel après la mise bas. En conclusion, la faible survie des descendants des souris obèses serait due à une interaction entre la souche de souris et le régime HFD, au cours de la gestation et la lactation. Pour obtenir une meilleure survie de ces descendants ou effectuer des adoptions croisées, je proposerais d'utiliser d'autres souches de souris. Par exemple, les femelles de la lignée C3H, se caractérisent par un meilleur comportement maternel et développent une obésité sous régime HFD (Mathou A, Xia L, Minni A, Marion C, Gabory A, Delpierre C, Junien C, Darnaudery M. Impact of early life stress in mice on food motivation : strain and sex effects, en préparation).

3-3) Perspectives

3-3-1) Effets des trajectoires pondérales maternelles sur le comportement alimentaire, le système cardio-vasculaire et l'anxiété

Après le sevrage, nous avons observé un effet de l'obésité maternelle sur la vitesse de prise de poids des mâles dans les conditions obésogènes. Il est néanmoins important de garder à l'esprit que bien d'autres paramètres pourraient être altérés par l'environnement maternel. L'obésité maternelle est associée à un risque de pathologies cardio-vasculaires chez la descendance adulte (Gaillard, 2015; Khan et al., 2003). Chez la souris, des altérations de la morphologie et du fonctionnement du cœur, ainsi que de l'expression génique dans cet organe, sont observés chez les descendants des mères obèses adultes (Blackmore et al., 2014). De manière intéressante, dans cette étude, aucun effet significatif n'a été observé sur les niveaux de cholestérol et de triglycérides circulants, et sur le poids corporel des descendants sous régime " cafétéria ". La même souche de souris, C57BL/6J, a été utilisée dans notre modèle.

De plus, l'obésité maternelle pourrait affecter le comportement des descendants. Le régime HFD chronique chez la souris prédispose la descendance à un comportement anxieux (Kang et al., 2014). Ce conditionnement du comportement est associé à des altérations de l'expression des gènes codant des récepteurs de neurotransmetteurs, sérotonine et acide γ-aminobutyrique (GABA), dans l'hippocampe (Peleg-Raibstein et al., 2012). Selon des données récentes de la même équipe, le régime HFD maternel n'affecte pas le poids corporel et les paramètres métaboliques des descendants. En revanche, leur circuit neuronal de récompense, plus particulièrement le système dopaminérgique, était affecté, ce qui est associé à une augmentation des comportements hédoniques (réponse à l'amphétamine et à la cocaïne, consommation plus élevée d'alcool et de sucrose). Les préférences alimentaires de la

descendance sont ainsi conditionnées : si les descendants de mères HFD sont placés devant un choix entre les régimes CD et HFD, ils consomment plus de nourriture HFD et développent par la suite le syndrome métabolique (Peleg-Raibstein, non publié, communication de C. Wolfrum, conférence au congrès "Epigenetics, Obesity and Metabolism", octobre 2015, Cambridge).

Ainsi, en utilisant notre modèle expérimental, nous pouvons proposer de nouvelles voies de recherche sur les effets à longs terme de l'obésité maternelle : le système de récompense qui contrôle les choix et les motivations alimentaires, l'état émotionnel, la pression artérielle, le fonctionnement du cœur, ou encore d'autres paramètres qui n'ont pas été pris en compte à ce jour. Dans notre modèle, il serait intéressant de proposer aux descendants des mères obèses et WL le libre choix entre le régime CD et HFD après le sevrage, afin de tester leurs préférences alimentaires et leur phénotype métabolique. La pression artérielle pourrait également être mesurée, tout comme le comportement locomoteur et anxieux en espace ouvert (test d'"*open field*").

3-3-2) Effets transgénérationnels des trajectoires pondérales maternelles et mécanismes épigénétiques sous-jacents

Chez les souris C57BL/6J, le régime HFD maternel conditionne le phénotype métabolique de la descendance de la 2ème génération (King et al., 2013a). L'expression de certains gènes métaboliques est altérée dans le foie des descendants mâles (*Pparα, Pgc1α, FAS, GR*) et femelles (*Lpl, Pck, Pparα, Pgc1α*). Ainsi, dans notre modèle, les descendants de la 2ème génération des souris OB et WL auraient des altérations métaboliques. Afin de comprendre les mécanismes de la transmission du phénotype (restauration partielle du poids fœtal, absence de normalisation de l'expression de certains gènes) pendant la période préconceptionnelle, un intérêt particulier pourraitêtre porté sur le développement ovocytaire. L'obésité et le métabolisme de la femelle ont un impact sur les ovocytes, en termes de métabolisme et de marques épigénétiques, ainsi que sur le développement consécutif de l'embryon, voire sur le phénotype de la descendance (Ge et al., 2013; Jungheim et al., 2010; Luzzo et al., 2012; Wei et al., 2015; Wu et al., 2010). Des changements métaboliques associés à la perte de poids maternelle en période préconceptionnelle pourraient altérer le fonctionnement ovocytaire et son épigénome. Étant donné que nous avons observé une réponse transcriptionnelle des gènes de l'acétylation des histones dans le placenta et dans le foie fœtal, une question intéressante se pose : l'acétylation des histones est-elle sensible à l'obésité et à la perte de poids maternelle dans les ovocytes de femelles ? Chez la souris, le niveau de marques d'acétylation ainsi que l'expression

des gènes de HDACs et de KATs est altéré dans l'ovocyte en cas de diabète (Ding et al., 2012). Au cours du développement *in utero*, les gonades du fœtus peuvent subir des effets de l'environnement maternel. Cela expliquerait les effets éventuels des trajectoires pondérales sur la 2ème génération.

4) Comparaison des cohortes à court et à long terme

L'un des objectifs de cette thèse était d'établir le lien entre une restriction de croissance fœtale, les altérations épigénétiques induits par l'obésité maternelle et le phénotype de la descendance à l'âge adulte "conditionné" par l'environnement maternel (Figure 52). Un autre objectif visait à savoir si la perte de poids préconceptionnelle annulait ou non les effets négatifs potentiels de l'obésité sur la santé à court et à long terme. Pour étudier les effets des trajectoires pondérales sur la descendance à court terme, les fœtus ont été prélevés à E18.5 dans un lot de femelles. Pour l'étude des effets à long terme, les femelles de deux autres lots ont mis bas naturellement et les descendants ont été suivis jusqu'à l'âge adulte. Nous avons démontré que l'obésité maternelle provoquait une restriction de croissance fœtale et des altérations d'expression génique au terme de la gestation. A l'âge adulte, les mâles nés des mères obèses ont un gain de poids plus rapide sous régime obésogène après sevrage.

Nous pensons que la restriction de croissance fœtale à terme et le taux de survie extrêmement faible au 1er jour après la naissance chez les mères obèses, peuvent être liés. Les descendants qui ont été qualifié SGA à terme (presque un tiers), seraient trop faibles à la naissance et ne pourraient pas s'alimenter correctement. Ainsi, les fœtus de faible poids sont probablement parmi les individus qui n'ont pas survécu. Cela pourrait induire un biais de sélection dans la population des descendants des mères obèses, étudiée jusqu'à l'âge adulte. Les données obtenues pour les fœtus à terme et les descendants adultes sont donc comparables avec prudence.

La restriction de croissance fœtale, observée dans la première cohorte, semble prédisposer la descendance à une aggravation de l'obésité induite par le régime riche en lipides. Les deux sexes ne sont pas équivalents dans le contexte de conditionnement développemental (Annexes, Junien et al., *in press*). Dans notre étude, les mâles semblent être plus susceptibles aux effets de l'obésité maternelle. Le lien mécanistique entre les altérations transcriptionnelles observés dans le placenta et le foie fœtal et le phénotype adulte reste à comprendre. La perte de poids en période préconceptionnelle est favorable pour la croissance fœtale et permet d'abolir les effets négatifs sur la descendance adulte.

5) Conclusions générales

Dans cette thèse, j'ai voulu comprendre les mécanismes moléculaires du conditionnement développemental du phénotype de la descendance par l'obésité maternelle. La deuxième question posée était de savoir si une correction de l'obésité maternelle, par la perte de poids en période préconceptionnelle, pouvait améliorer le phénotype de la descendance.

Tout d'abord, nous avons démontré que l'obésité maternelle provoquait une restriction de croissance fœtale au terme de la gestation. Ce phénotype était associé à une réponse transcriptionnelle dans le foie fœtal et le labyrinthe placentaire. Les gènes de la machinerie enzymatique impliquée dans l'acétylation des histones étaient particulièrement affectés par l'obésité maternelle. Ce travail de thèse, qui montre la sensibilité de cette machinerie épigénétique à l'environnement nutritionnel maternel, ouvre des perspectives sur son implication éventuelle dans le développement d'une restriction de croissance fœtale chez les femmes obèses.

La perte de poids et la normalisation des paramètres métaboliques de la mère en préconception permettent une restauration presque complète du poids fœtal. Cet effet bénéfique est accompagné d'une normalisation de l'expression génique, même si certains gènes restent différentiellement exprimés, entre les descendants des femelles qui ont perdu du poids et ceux des femelles contrôles. Ces travaux ont mis en évidence l'effet bénéfique de l'intervention nutritionnelle, en amont de la conception. La perte de poids a permis d'améliorer la croissance fœtale et l'expression génique, sans toutefois assurer une correction complète des effets de l'obésité préconceptionnelle.

Dans ce manuscrit de thèse, j'ai résumé les connaissances actuelles sur les origines développementales de maladies métaboliques à l'âge adulte, dans le contexte de l'obésité et la perte de poids maternelle. Nous avons voulu tester si la descendance des mères obèses, présentant une restriction de croissance à terme, était prédisposée à développer à l'âge adulte des maladies métaboliques. Nous avons observé des effets subtils de l'obésité maternelle sur la prise de poids de la descendance et ce uniquement pour les mâles. Cela apporte un message plutôt positif, car ces travaux montrent que l'environnement post-natal peut contribuer de manière plus importante dans le phénotype métabolique de l'individu que l'environnement maternel. Ces travaux ont montré que la perte de poids préconceptionnelle était bénéfique pour le phénotype de la descendance à long terme.

Les travaux de cette thèse apportent des réponses aux questionnements sur les évènements qui se produisent *in utero*, dans le contexte de l'obésité et de la perte de poids maternelle. Plus particulièrement, nous avons révélé une réponse importante des enzymes de la machinerie épigénétique au métabolisme maternel. Cette réponse transcriptionnelle des "*writers*" et des "*erasers*" des marques épigénétiques pourrait conduire à des altérations de l'épigénome fœtal et placentaire. Cette étude souligne l'importance de comprendre le rôle des régulateurs épigénétiques dans le contexte des pathologies métaboliques. Peu de preuves dans la littérature attestent les effets de l'intervention nutritionnelle chez les sujets obèses, chez l'homme et chez les rongeurs. Le modèle, développé au cours de cette thèse, nous permet d'apporter les premiers éléments sur les mécanismes éventuels du conditionnement développemental par la perte de poids précenceptionnelle maternelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aagaard-Tillery, K. M., Grove, K., Bishop, J., Ke, X., Fu, Q., McKnight, R. and Lane, R. H. (2008). Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *J. Mol. Endocrinol.* **41**, 91–102.

Acosta, O., Ramirez, V. I., Lager, S., Gaccioli, F., Dudley, D. J., Powell, T. L. and Jansson, T. (2015). Increased glucose and placental GLUT-1 in large infants of obese nondiabetic mothers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **212**, 227.e1–227.e7.

Adenot, P. G., Szöllösi, M. S., Geze, M., Renard, J. P. and Debey, P. (1991). Dynamics of paternal chromatin changes in live one-cell mouse embryo after natural fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **28**, 23–34.

Adenot, P. G., Mercier, Y., Renard, J.-P. and Thompson, E. M. (1997). Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* **124**, 4615–4625.

Akhtar, R. A., Reddy, A. B., Maywood, E. S., Clayton, J. D., King, V. M., Smith, A. G., Gant, T. W., Hastings, M. H. and Kyriacou, C. P. (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr. Biol.* **12**, 540–550.

Alder, O., Lavial, F., Helness, A., Brookes, E., Pinho, S., Chandrashekran, A., Arnaud, P., Pombo, A., O'Neill, L. and Azuara, V. (2010). Ring1B and Suv39h1 delineate distinct chromatin states at bivalent genes during early mouse lineage commitment. *Development* **137**, 2483–2492.

Alfaradhi, M. Z. and Ozanne, S. E. (2011). Developmental Programming in Response to Maternal Overnutrition. *Front. Genet.* **2**,.

Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. and Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* **63**, 895–902.

Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C. and Proietto, J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *AJP Endocrinol. Metab.* **295**, E1323–E1332.

Anson-Cartwright, L., Dawson, K., Holmyard, D., Fisher, S. J., Lazzarini, R. A. and Cross, J. C. (2000). The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat. Genet.* **25**, 311–314.

Arima, T., Hata, K., Tanaka, S., Kusumi, M., Li, E., Kato, K., Shiota, K., Sasaki, H. and Wake, N. (2006). Loss of the maternal imprint in Dnmt3L mat-/- mice leads to a differentiation defect in the extraembryonic tissue. *Dev. Biol.* **297**, 361–373.

Armitage, J. A., Lakasing, L., Taylor, P. D., Balachandran, A. A., Jensen, R. I., Dekou, V., Ashton, N., Nyengaard, J. R. and Poston, L. (2005). Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy: Programming adult aortic and renal dysfunction by maternal fat-rich diet. *J. Physiol.* **565**, 171–184.

Asahina, K., Zhou, B., Pu, W. T. and Tsukamoto, H. (2011). Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology* **53**, 983–995.

Ashino, N. G., Saito, K. N., Souza, F. D., Nakutz, F. S., Roman, E. A., Velloso, L. A., Torsoni, A. S. and Torsoni, M. A. (2012). Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 341–348.

Attig, L., Gabory, A. and Junien, C. (2010). Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **13**, 284–293.

Attig, L., Vigé, A., Gabory, A., Karimi, M., Beauger, A., Gross, M.-S., Athias, A., Gallou-Kabani, C., Gambert, P., Ekstrom, T. J., et al. (2013). Dietary alleviation of maternal obesity and diabetes: increased resistance to diet-induced obesity transcriptional and epigenetic signatures. *PloS One* **8**, e66816.

Aye, I. L. M. H., Rosario, F. J., Powell, T. L. and Jansson, T. (2015). Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 12858–12863.

Ayer, J., Charakida, M., Deanfield, J. E. and Celermajer, D. S. (2015). Lifetime risk: childhood obesity and cardiovascular risk. *Eur. Heart J.*

Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., Koder, A. and Evans, R. M. (1999). PPARγ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* **4**, 585–595.

Barker, D. J. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* **301**, 1111.

Barker, D., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D. and Wadsworth, M. E. (1989). Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Bmj* **298**, 564–567.

Barker, D. J. P., Gelow, J., Thornburg, K., Osmond, C., Kajantie, E. and Eriksson, J. G. (2010). The early origins of chronic heart failure: impaired placental growth and initiation of insulin resistance in childhood. *Eur. J. Heart Fail.* **12**, 819–825.

Barrero, M. J., Boué, S. and Izpisúa Belmonte, J. C. (2010). Epigenetic Mechanisms that Regulate Cell Identity. *Cell Stem Cell* **7**, 565–570.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. and Walker, S. (2014). Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4. *arXiv:1406.5823*.

Baumwell, S. and Karumanchi, S. A. (2007). Pre-Eclampsia: Clinical Manifestations and Molecular Mechanisms. *Nephron Clin. Pract.* **106**, c72–c81.

Beath, S. . (2003). Hepatic function and physiology in the newborn. *Semin. Neonatol.* **8**, 337–346.

Beaujean, N. (2014). Histone post-translational modifications in preimplantation mouse embryos and their role in nuclear architecture: HISTONE PTMs AND NUCLEAR ARCHITECTURE IN MOUSE EMBRYOS. *Mol. Reprod. Dev.* **81**, 100–112.

Begum, G., Davies, A., Stevens, A., Oliver, M., Jaquiery, A., Challis, J., Harding, J., Bloomfield, F. and White, A. (2013). Maternal Undernutrition Programs Tissue-Specific Epigenetic Changes in the Glucocorticoid Receptor in Adult Offspring. *Endocrinology* **154**, 4560–4569.

Bellamy, L., Casas, J.-P., Hingorani, A. D. and Williams, D. (2009). Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* **373**, 1773–1779.

Bellisario, V., Panetta, P., Balsevich, G., Baumann, V., Noble, J., Raggi, C., Nathan, O., Berry, A., Seckl, J., Schmidt, M., et al. (2015). Maternal high-fat diet acts as a stressor increasing maternal glucocorticoids' signaling to the fetus and disrupting maternal behavior and brain activation in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology* **60**, 138–150.

Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **57**, 289–300.

Bhutani, N., Burns, D. M. and Blau, H. M. (2011). DNA Demethylation Dynamics. *Cell* **146**, 866–872.

Binder, N. K., Hannan, N. J. and Gardner, D. K. (2012). Paternal Diet-Induced Obesity Retards Early Mouse Embryo Development, Mitochondrial Activity and Pregnancy Health. *PLoS ONE* **7**, e52304.

Blackmore, H. L., Niu, Y., Fernandez-Twinn, D. S., Tarry-Adkins, J. L., Giussani, D. A. and Ozanne, S. E. (2014). Maternal Diet-induced Obesity Programs Cardiovascular Dysfunction in Adult Male Mouse Offspring Independent of Current Body Weight. *Endocrinology* **155**, 3970–3980.

Bloor, I. D. and Symonds, M. E. (2014). Sexual dimorphism in white and brown adipose tissue with obesity and inflammation. *Horm. Behav.* **66**, 95–103.

Blouin, A., Bolender, R. P. and Weibel, E. R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* **72**, 441–455.

Bogaerts, A., Ameye, L., Martens, E. and Devlieger, R. (2015). Weight loss in obese pregnant women and risk for adverse perinatal outcomes. *Obstet. Gynecol.* **125**, 566–575.

Bonifer, C. and Cockerill, P. N. (2011). Chromatin mechanisms regulating gene expression in health and disease. In *Epigenetic Contributions in Autoimmune Disease*, pp. 12–25. Springer.

Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M. L., King, J., Shih, J. C., Blakely, R. D., Deneris, E. S. and Levitt, P. (2011). A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* **472**, 347–350.

Borengasser, S. J., Zhong, Y., Kang, P., Lindsey, F., Ronis, M. J. J., Badger, T. M., Gomez-Acevedo, H. and Shankar, K. (2013). Maternal Obesity Enhances White Adipose Tissue Differentiation and Alters Genome-Scale DNA Methylation in Male Rat Offspring. *Endocrinology* **154**, 4113–4125.

Borengasser, S. J., Kang, P., Faske, J., Gomez-Acevedo, H., Blackburn, M. L., Badger, T. M. and Shankar, K. (2014a). High Fat Diet and In Utero Exposure to Maternal Obesity Disrupts Circadian Rhythm and Leads to Metabolic Programming of Liver in Rat Offspring. *PLoS ONE* **9**, e84209.

Borengasser, S. J., Faske, J., Kang, P., Blackburn, M. L., Badger, T. M. and Shankar, K. (2014b). In utero exposure to prepregnancy maternal obesity and postweaning high-fat diet impair regulators of mitochondrial dynamics in rat placenta and offspring. *Physiol. Genomics* **46**, 841–850.

Bouchard, L., Thibault, S., Guay, S.-P., Santure, M., Monpetit, A., St-Pierre, J., Perron, P. and Brisson, D. (2010). Leptin Gene Epigenetic Adaptation to Impaired Glucose Metabolism During Pregnancy. *Diabetes Care* **33**, 2436–2441.

Brett, K., Ferraro, Z., Yockell-Lelievre, J., Gruslin, A. and Adamo, K. (2014). Maternal–Fetal Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 16153–16185.

Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F., Girard, J., Postic, C. and Dentin, R. (2010). Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 4316–4331.

Bruce, K. D., Cagampang, F. R., Argenton, M., Zhang, J., Ethirajan, P. L., Burdge, G. C., Bateman, A. C., Clough, G. F., Poston, L., Hanson, M. A., et al. (2009). Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology* **50**, 1796–1808.

Burdge, G. C. and Lillycrop, K. A. (2014). Fatty acids and epigenetics: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **17**, 156–161.

Burdge, G. C., Slater-Jefferies, J., Torrens, C., Phillips, E. S., Hanson, M. A. and Lillycrop, K. A. (2007). Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br. J. Nutr.* **97**, 435.

Butler, J. S., Dent, S. Y. (2013). The Role of Chromatin Modifiers in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Blood* 121, **16**: 3076–84.

Cannon, M. V., Buchner, D. A., Hester, J., Miller, H., Sehayek, E., Nadeau, J. H. and Serre, D. (2014). Maternal Nutrition Induces Pervasive Gene Expression Changes but No Detectable DNA Methylation Differences in the Liver of Adult Offspring. *PLoS ONE* **9**, e90335.

Cantone, I. and Fisher, A. G. (2013). Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 282–289.

Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L. and Côté, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**, 321–329.

Casas, E. and Vavouri, T. (2014). Sperm epigenomics: challenges and opportunities. *Front. Genet.* **5**,.

Catalano, P. and deMouzon, S. H. (2015). Maternal obesity and metabolic risk to the offspring: why lifestyle interventions may have not achieved the desired outcomes. *Int. J. Obes.* **39**, 642–649.

Catalano, P. M., Presley, L., Minium, J. and Hauguel-de Mouzon, S. (2009a). Fetuses of Obese Mothers Develop Insulin Resistance in Utero. *Diabetes Care* **32**, 1076–1080.

Catalano, P. M., Farrell, K., Thomas, A., Huston-Presley, L., Mencin, P., de Mouzon, S. H. and Amini, S. B. (2009b). Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. *Am. J. Clin. Nutr.* **90**, 1303–1313.

Çatlı, G., Olgaç Dündar, N. and Dündar, B. N. (2014). Adipokines in breast milk: an update. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* **6**, 192–201.

Challier, J. C., Basu, S., Bintein, T., Minium, J., Hotmire, K., Catalano, P. M. and Hauguel-de Mouzon, S. (2008). Obesity in Pregnancy Stimulates Macrophage Accumulation and Inflammation in the Placenta. *Placenta* **29**, 274–281.

Chang, C.-J., Jian, D.-Y., Lin, M.-W., Zhao, J.-Z., Ho, L.-T. and Juan, C.-C. (2015). Evidence in Obese Children: Contribution of Hyperlipidemia, Obesity-Inflammation, and Insulin Sensitivity. *PLOS ONE* **10**, e0125935.

Chapman, V., Forrester, L., Sanford, J., Hastie, N. and Rossant, J. (1984). Cell lineage-specific undermethylation of mouse repetitive DNA. *Nature* **307**, 284–286.

Chatterjee, T. K., Idelman, G., Blanco, V., Blomkalns, A. L., Piegore, M. G., Weintraub, D. S., Kumar, S., Rajsheker, S., Manka, D., Rudich, S. M., et al. (2011). Histone Deacetylase 9 Is a Negative Regulator of Adipogenic Differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 27836–27847.

Chen, T., Y. Ueda, J. E. Dodge, Z. Wang, and E. Li. (2003). Establishment and Maintenance of Genomic Methylation Patterns in Mouse Embryonic Stem Cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Molecular and Cellular Biology* **23**, no. 16 5594–5605.

Clifton, V. L. (2010). Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival. *Placenta* **31**, S33–S39.

Colomiere, M., Permezel, M., Riley, C., Desoye, G. and Lappas, M. (2009). Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* **160**, 567–578.

Conradt, E., Lester, B. M., Appleton, A. A., Armstrong, D. A. and Marsit, C. J. (2013). The roles of DNA methylation of *NR3C1* and *11β-HSD2* and exposure to maternal mood disorder in utero on newborn neurobehavior. *Epigenetics* **8**, 1321–1329.

Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., et al. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292–295.

Coste, A., Louet, J.-F., Lagouge, M., Lerin, C., Antal, M. C., Meziane, H., Schoonjans, K., Puigserver, P., O'Malley, B. W. and Auwerx, J. (2008). The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1α. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 17187–17192.

Couture, J.-P., Nolet, G., Beaulieu, E., Blouin, R. and Gévry, N. (2012). The p400/Brd8 chromatin remodeling complex promotes adipogenesis by incorporating histone variant H2A.Z at PPARγ target genes. *Endocrinology* **153**, 5796–5808.

Crawford, L. W., Foley, J. F. and Elmore, S. A. (2010). Histology Atlas of the Developing Mouse Hepatobiliary System with Emphasis on Embryonic Days 9.5-18.5. *Toxicol. Pathol.* **38**, 872–906.

Crujeiras, A. B., Parra, D., Goyenechea, E. and Martínez, J. A. (2008). Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *Eur. J. Clin. Invest.* **38**, 672–678.

Crujeiras, A. B., Campion, J., Díaz-Lagares, A., Milagro, F. I., Goyenechea, E., Abete, I., Casanueva, F. F. and Martínez, J. A. (2013). Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: A translational study. *Regul. Pept.* **186**, 1–6.

Crujeiras, A. B., Carreira, M. C., Cabia, B., Andrade, S., Amil, M. and Casanueva, F. F. (2015). Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sci.*

Damiano, A. E. (2011). Review: Water channel proteins in the human placenta and fetal membranes. *Placenta* **32**, S207–S211.

Davie, J. R. (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* **133**, 2485S–2493S.

Delage, B. and Dashwood, R. H. (2008). Dietary manipulation of histone structure and function. *Annu. Rev. Nutr.* **28**, 347–366.

Delahaye, F., Wijetunga, N. A., Heo, H. J., Tozour, J. N., Zhao, Y. M., Greally, J. M. and Einstein, F. H. (2014). Sexual dimorphism in epigenomic responses of stem cells to extreme fetal growth. *Nat. Commun.* **5**, 5187.

Desai, M. and Ross, M. G. (2011). Fetal programming of adipose tissue: effects of intrauterine growth restriction and maternal obesity/high-fat diet. *Semin. Reprod. Med.* **29**, 237–245.

Desforges, M. and Sibley, C. P. (2010). Placental nutrient supply and fetal growth. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 377–390.

Díaz, P., Harris, J., Rosario, F. J., Powell, T. L. and Jansson, T. (2015). Increased placental fatty acid transporter 6 and binding protein 3 expression and fetal liver lipid accumulation in a mouse model of obesity in pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* ajpregu.00385.2015.

Dilworth, M. R., Kusinski, L. C., Baker, B. C., Renshall, L. J., Greenwood, S. L., Sibley, C. P. and Wareing, M. (2011). Defining fetal growth restriction in mice: A standardized and clinically relevant approach. *Placenta* **32**, 914–916.

Ding, L., Pan, R., Huang, X., Wang, J.-X., Shen, Y.-T., Xu, L., Zhang, Y., Liu, Y., He, X.-Q., Yang, X.-J., et al. (2012). Changes in histone acetylation during oocyte meiotic maturation in the diabetic mouse. *Theriogenology* **78**, 784–792.

Diouf, I., Charles, M. A., Thiebaugeorges, O., Forhan, A., Kaminski, M., Heude, B. and EDEN Mother–Child Cohort Study Group (2011). Maternal weight change before pregnancy in relation to birthweight and risks of adverse pregnancy outcomes. *Eur. J. Epidemiol.* **26**, 789–796.

Dolatshad, H., Cary, A. J. and Davis, F. C. (2010). Differential Expression of the Circadian Clock in Maternal and Embryonic Tissues of Mice. *PLoS ONE* **5**, e9855.

Donohoe, D. R. and Bultman, S. J. (2012). Metaboloepigenetics: Interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3169–3177.

Du, Y., Liu, B., Guo, F., Xu, G., Ding, Y., Liu, Y., Sun, X. and Xu, G. (2012). The Essential Role of Mbd5 in the Regulation of Somatic Growth and Glucose Homeostasis in Mice. *PLoS ONE* **7**, e47358.

Dube, E., Gravel, A., Martin, C., Desparois, G., Moussa, I., Ethier-Chiasson, M., Forest, J.-C., Giguere, Y., Masse, A. and Lafond, J. (2012). Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta. *Biol. Reprod.* **87**, 14–14.

D'Urso, A. and Brickner, J. H. (2014). Mechanisms of epigenetic memory. *Trends Genet. TIG* **30**, 230–236.

Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L.-H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A. and Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2709–2721.

Elahi, M. M., Cagampang, F. R., Mukhtar, D., Anthony, F. W., Ohri, S. K. and Hanson, M. A. (2009). Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br. J. Nutr.* **102**, 514.

Eriksson, J., Forsen, T., Tuomilehto, J., Osmond, C. and Barker, D. (2000). Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension* **36**, 790–794.

Falkenberg, K. J. and Johnstone, R. W. (2014). Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer, Neurological Diseases and Immune Disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 13, no. **9**: 673–91.

Fall, T. and Ingelsson, E. (2014). Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 740–757.

Farley, D. M., Choi, J., Dudley, D. J., Li, C., Jenkins, S. L., Myatt, L. and Nathanielsz, P. W. (2010). Placental Amino Acid Transport and Placental Leptin Resistance in Pregnancies Complicated by Maternal Obesity☆. *Placenta* **31**, 718–724.

Feng, D. and Lazar, M. A. (2012). Clocks, Metabolism, and the Epigenome. *Mol. Cell* **47**, 158–167.

Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S. E., Alenghat, T., Liu, X. S. and Lazar, M. A. (2011). A Circadian Rhythm Orchestrated by Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. *Science* **331**, 1315–1319.

Fernandez-Twinn, D. S. and Ozanne, S. E. (2006). Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiol. Behav.* **88**, 234–243.

Filippakopoulos, P. and Knapp, S. (2014). Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 337–356.

Finer, S., Mathews, C., Lowe, R., Smart, M., Hillman, S., Foo, L., Sinha, A., Williams, D., Rakyan, V. K. and Hitman, G. A. (2015). Maternal gestational diabetes is associated with genome-wide DNA methylation variation in placenta and cord blood of exposed offspring. *Hum. Mol. Genet.*

Fogarty, N. M. E., Burton, G. J. and Ferguson-Smith, A. C. (2015). Different epigenetic states define syncytiotrophoblast and cytotrophoblast nuclei in the trophoblast of the human placenta. *Placenta* **36**, 796–802.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. and others (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497–509.

Forsdahl, A. (1977). Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br. J. Prev. Soc. Med.* **31**, 91–95.

Forsum, E., Brantsæter, A. L., Olafsdottir, A.-S., Olsen, S. F. and Thorsdottir, I. (2013). Weight loss before conception: A systematic literature review. *Food Nutr. Res.* **57**,.

Fox, J. and Sanford, W. (2011). *An {R} Companion to Applied Regression*. second. Thousand Oaks {CA}: Sage.

Frias, A. E., Morgan, T. K., Evans, A. E., Rasanen, J., Oh, K. Y., Thornburg, K. L. and Grove, K. L. (2011). Maternal High-Fat Diet Disturbs Uteroplacental Hemodynamics and Increases the Frequency of Stillbirth in a Nonhuman Primate Model of Excess Nutrition. *Endocrinology* **152**, 2456–2464.

Frevert, U., Engelmann, S., Zougbédé, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski K., Liebes, L. and Yee, H. (2005). Intravital Observation of Plasmodium Berghei Sporozoite Infection of the Liver. *PLoS Biology* 3, no. **6**: e192.

Fu, Q. (2004). Uteroplacental insufficiency induces site-specific changes in histone H3 covalent modifications and affects DNA-histone H3 positioning in day 0 IUGR rat liver. *Physiol. Genomics* **20**, 108–116.

Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 490–495.

Funato, H., Oda, S., Yokofujita, J., Igarashi, H. and Kuroda, M. (2011). Fasting and High-Fat Diet Alter Histone Deacetylase Expression in the Medial Hypothalamus. *PLoS ONE* **6**, e18950.

Fyffe, S. L., Neul, J. L., Samaco, R. C., Chao, H.-T., Ben-Shachar, S., Moretti, P., McGill, B. E., Goulding, E. H., Sullivan, E., Tecott, L. H., et al. (2008). Deletion of Mecp2 in Sim1-expressing neurons reveals a critical role for MeCP2 in feeding behavior, aggression, and the response to stress. *Neuron* **59**, 947–958.

Gabory, A., Ripoche, M.-A., Le Digarcher, A., Watrin, F., Ziyyat, A., Forné, T., Jammes, H., Ainscough, J. F. X., Surani, M. A., Journot, L., et al. (2009). H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 3413–3421.

Gabory, A., Attig, L. and Junien, C. (2011). Developmental programming and epigenetics. *Am. J. Clin. Nutr.* **94**, 1943S–1952S.

Gabory, A., Ferry, L., Fajardy, I., Jouneau, L., Gothié, J.-D., Vigé, A., Fleur, C., Mayeur, S., Gallou-Kabani, C., Gross, M.-S., et al. (2012). Maternal Diets Trigger Sex-Specific Divergent Trajectories of Gene Expression and Epigenetic Systems in Mouse Placenta. *PLoS ONE* **7**, e47986.

Gabory, A., Roseboom, T. J., Moore, T., Moore, L. G. and Junien, C. (2013). Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biol Sex Differ* **4**, 10–1186.

Gaillard, R. (2015). Maternal obesity during pregnancy and cardiovascular development and disease in the offspring. *Eur. J. Epidemiol.*

Gallou-Kabani, C., Gabory, A., Tost, J., Karimi, M., Mayeur, S., Lesage, J., Boudadi, E., Gross, M.-S., Taurelle, J., Vigé, A., et al. (2010). Sex- and Diet-Specific Changes of Imprinted Gene Expression and DNA Methylation in Mouse Placenta under a High-Fat Diet. *PLoS ONE* **5**, e14398.

Ganguly, A., Collis, L. and Devaskar, S. U. (2012). Placental Glucose and Amino Acid Transport in Calorie-Restricted Wild-Type and Glut3 Null Heterozygous Mice. *Endocrinology* **153**, 3995–4007.

Ganguly, A., Chen, Y., Shin, B.-C. and Devaskar, S. U. (2014). Prenatal caloric restriction enhances DNA methylation and MeCP2 recruitment with reduced murine placental glucose transporter isoform 3 expression. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 259–266.

Garaulet, M., Corbalan, M. D., Madrid, J. A., Morales, E., Baraza, J. C., Lee, Y.-C. and Ordovas, J. M. (2010). CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet. *Int. J. Obes.* **34**, 516–523.

Gathercole, L. L., Morgan, S. A. and Tomlinson, J. W. (2013). Hormonal Regulation of Lipogenesis. In *Vitamins & Hormones*, pp. 1–27. Elsevier.

Gaudet, L., Ferraro, Z. M., Wen, S. W. and Walker, M. (2014). Maternal Obesity and Occurrence of Fetal Macrosomia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–22.

Ge, Z.-J., Luo, S.-M., Lin, F., Liang, Q.-X., Huang, L., Wei, Y.-C., Hou, Y., Han, Z.-M., Schatten, H. and Sun, Q.-Y. (2013). DNA Methylation in Oocytes and Liver of Female Mice and Their Offspring: Effects of High-Fat-Diet–Induced Obesity. *Environ. Health Perspect.*

Gentric, G. and Desdouets, C. (2014). Polyploidization in liver tissue. *Am. J. Pathol.* **184**, 322–331.

Georgiades, P., Ferguson-Smith, A. C. and Burton, G. J. (2002). Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. *Placenta* **23**, 3–19.

Gheorghe, C. P., Goyal, R., Mittal, A. and Longo, L. D. (2010). Gene expression in the placenta: maternal stress and epigenetic responses. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 507–523.

Gibney, E. R. and Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity* **105**, 4–13.

Godfrey, K. M. (2002). The Role of the Placenta in Fetal Programming—A Review. *Placenta* **23**, S20–S27.

Goeden, N., Velasquez, J. C. and Bonnin, A. (2013). Placental tryptophan metabolism as a potential novel pathway for the developmental origins of mental diseases. *Transl. Dev. Psychiatry* 1: 20593.

Grandjean, V., Badro, D. A. and Kiani, J. (2013). RNA: a possible contributor to the "missing heritability." *Basic Clin. Androl.* **23**, 9.

Greenway, F. L. (2015). Physiological adaptations to weight loss and factors favouring weight regain. *Int. J. Obes.* **39**, 1188–1196.

Gregorio, B. M., Souza-Mello, V., Carvalho, J. J., Mandarim-de-Lacerda, C. A. and Aguila, M. B. (2010). Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **203**, 495.e1–495.e8.

Grijalva, J. and Vakili, K. (2013). Neonatal liver physiology. *Semin. Pediatr. Surg.* **22**, 185–189.

Guan, K.-L. and Xiong, Y. (2011). Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 108–116.

Gupta, J., Kumar, S., Li, J., Krishna Murthy Karuturi, R. and Tikoo, K. (2012). Histone H3 lysine 4 monomethylation (H3K4me1) and H3 lysine 9 monomethylation (H3K9me1): distribution and their association in regulating gene expression under hyperglycaemic/hyperinsulinemic conditions in 3T3 cells. *Biochimie* **94**, 2656–2664.

Hackett, J. A. and Surani, M. A. (2012). DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, 20110328–20110328.

Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Karow, M., Blander, G., et al. (2006). SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells. *Cell* **126**, 941–954.

Hales, C. N., Barker, D. J., Clark, P. M., Cox, L. J., Fall, C., Osmond, C. and Winter, P. D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* **303**, 1019–1022.

Haluzík, M., Parízková, J. and Haluzík, M. M. (2004). Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* **53**, 123–129.

Han, H.-S., Choi, D., Choi, S. and Koo, S.-H. (2014). Roles of Protein Arginine Methyltransferases in the Control of Glucose Metabolism. *Endocrinol. Metab.* **29**, 435.

Hanson, M. A. and Gluckman, P. D. (2014). Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? *Physiol. Rev.* **94**, 1027–1076.

Hartil, K., Vuguin, P. M., Kruse, M., Schmuel, E., Fiallo, A., Vargas, C., Warner, M. J., Durand, J. L., Jelicks, L. A. and Charron, M. J. (2009). Maternal substrate utilization programs the development of the metabolic syndrome in male mice exposed to high fat in utero. *Pediatr. Res.* **66**, 368–373.

Hastie, R. and Lappas, M. (2014). The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity. *Placenta* **35**, 673–683.

Haute Autorité de Santé (2011). Surpoids et obésité de l'adulte - prise en charge médicale de premier recours. Recommandations pour la pratique clinique.

Hayes, E. K., Lechowicz, A., Petrik, J. J., Storozhuk, Y., Paez-Parent, S., Dai, Q., Samjoo, I. A., Mansell, M., Gruslin, A., Holloway, A. C., et al. (2012). Adverse Fetal and Neonatal Outcomes Associated with a Life-Long High Fat Diet: Role of Altered Development of the Placental Vasculature. *PLoS ONE* **7**, e33370.

Heard, E. (2012) Épigénétique: Comment Se Joue La Partition Du Génome ? *Science & Santé*. **11**, 22-33.

Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E. and Lumey, L. H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 17046–17049.

Hemberger, M. (2007). Epigenetic landscape required for placental development. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2422–2436.

Herrmann, D., Dahl, J. A., Lucas-Hahn, A., Collas, P. and Niemann, H. (2013). Histone modifications and mRNA expression in the inner cell mass and trophectoderm of bovine blastocysts. *Epigenetics* **8**, 281–289.

Hiden, U., Glitzner, E., Hartmann, M. and Desoye, G. (2009). Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *J. Anat.* **215**, 60–68.

Hirschey, M. D., Shimazu, T., Jing, E., Grueter, C. A., Collins, A. M., Aouizerat, B., Stančáková, A., Goetzman, E., Lam, M. M., Schwer, B., et al. (2011). SIRT3 Deficiency and Mitochondrial Protein Hyperacetylation Accelerate the Development of the Metabolic Syndrome. *Mol. Cell* **44**, 177–190.

Hochner, H., Friedlander, Y., Calderon-Margalit, R., Meiner, V., Sagy, Y., Avgil-Tsadok, M., Burger, A., Savitsky, B., Siscovick, D. S. and Manor, O. (2012). Associations of Maternal Prepregnancy Body Mass Index and Gestational Weight Gain With Adult Offspring Cardiometabolic Risk Factors: The Jerusalem Perinatal Family Follow-Up Study. *Circulation* **125**, 1381–1389.

Howie, G. J., Sloboda, D. M., Kamal, T. and Vickers, M. H. (2009). Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet: Maternal high fat nutrition and obesity in offspring. *J. Physiol.* **587**, 905–915.

Hu, D. and Cross, J. C. (2010). Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 341–354.

Huang, L., Liu, J., Feng, L., Chen, Y., Zhang, J. and Wang, W. (2014). Maternal prepregnancy obesity is associated with higher risk of placental pathological lesions. *Placenta* **35**, 563–569.

Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C. and Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129–1133.

Jenkins, T. G. and Carrell, D. T. (2012). Dynamic alterations in the paternal epigenetic landscape following fertilization. *Front. Genet.* **3**,.

Jensen Peña, C., Monk, C. and Champagne, F. A. (2012). Epigenetic Effects of Prenatal Stress on 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and Fetal Brain. *PLoS ONE* **7**, e39791.

Jiang, M., Zhang, Y., Liu, M., Lan, M. S., Fei, J., Fan, W., Gao, X. and Lu, D. (2011). Hypermethylation of Hepatic Glucokinase and L-Type Pyruvate Kinase Promoters in High-Fat Diet–Induced Obese Rats. *Endocrinology* **152**, 1284–1289.

Jin, Q., Wang, C., Kuang, X., Feng, X., Sartorelli, V., Ying, H., Ge, K. and Dent, S. Y. R. (2014). Gcn5 and PCAF regulate PPARγ and Prdm16 expression to facilitate brown adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 3746–3753.

Jing, E., Gesta, S. and Kahn, C. R. (2007). SIRT2 Regulates Adipocyte Differentiation through FoxO1 Acetylation/Deacetylation. *Cell Metab.* **6**, 105–114.

Jitrapakdee, S. (2012). Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 33–45.

Jones, P. A. and Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**, 1068–1070.

Jones, H. N., Woollett, L. A., Barbour, N., Prasad, P. D., Powell, T. L. and 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.* **23**, 271–278.

Jousse, C., Parry, L., Lambert-Langlais, S., Maurin, A.-C., Averous, J., Bruhat, A., Carraro, V., Tost, J., Letteron, P., Chen, P., et al. (2011). Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *FASEB J.* **25**, 3271–3278.

Jun, H.-J., Kim, J., Hoang, M.-H. and Lee, S.-J. (2012). Hepatic Lipid Accumulation Alters Global Histone H3 Lysine 9 and 4 Trimethylation in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Network. *PLoS ONE* **7**, e44345.

Jungheim, E. S., Schoeller, E. L., Marquard, K. L., Louden, E. D., Schaffer, J. E. and Moley, K. H. (2010). Diet-Induced Obesity Model: Abnormal Oocytes and Persistent Growth Abnormalities in the Offspring. *Endocrinology* **151**, 4039–4046.

Junien, C., Gallou-Kabani, C., Vigé, A. and Gross, M.-S. (2005). Epigénomique nutritionnelle du syndrome métabolique. *MS Médecine Sci.* **21**, 396–404.

Junien, C., Gabory, A. and Attig, L. (2012). [Sexual dimorphism in the XXI(st) century]. *Médecine Sci. MS* **28**, 185–192.

Kato, S., Kazuki I., and Min-Young Y. (2010). Emergence of the Osteo-Epigenome in Bone Biology. *IBMS BoneKEy* 7, no. **9:** 314–24.

Kanfi, Y., Shalman, R., Peshti, V., Pilosof, S. N., Gozlan, Y. M., Pearson, K. J., Lerrer, B., Moazed, D., Marine, J.-C., de Cabo, R., et al. (2008). Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett.* **582**, 543–548.

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

Karlsson, B., Knutsson, A. and Lindahl, B. (2001). Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27 485 people. *Occup. Environ. Med.* **58**, 747–752.

Kearns, M. and Lala, P. K. (1983). Life History of Decidual Cells: A Review*. *Am. J. Reprod. Immunol.* **3**, 78–82.

Khan, I. Y., Taylor, P. D., Dekou, V., Seed, P. T., Lakasing, L., Graham, D., Dominiczak, A. F., Hanson, M. A. and Poston, L. (2003). Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* **41**, 168–175.

Kim, G.-W. and Yang, X.-J. (2011). Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 211–220.

Kim, H.-S., Xiao, C., Wang, R.-H., Lahusen, T., Xu, X., Vassilopoulos, A., Vazquez-Ortiz, G., Jeong, W.-I., Park, O., Ki, S. H., et al. (2010). Hepatic-Specific Disruption of SIRT6 in Mice Results in Fatty Liver Formation Due to Enhanced Glycolysis and Triglyceride Synthesis. *Cell Metab.* **12**, 224–236.

Kim, D. W., Young, S. L., Grattan, D. R. and Jasoni, C. L. (2014). Obesity During Pregnancy Disrupts Placental Morphology, Cell Proliferation, and Inflammation in a Sex-Specific Manner Across Gestation in the Mouse. *Biol. Reprod.* **90**, 130–130.

Kimura, A. (2005). A Decade of Histone Acetylation: Marking Eukaryotic Chromosomes with Specific Codes. *J. Biochem. (Tokyo)* **138**, 647–662.

King, V., Dakin, R. S., Liu, L., Hadoke, P. W. F., Walker, B. R., Seckl, J. R., Norman, J. E. and Drake, A. J. (2013a). Maternal Obesity Has Little Effect on the Immediate Offspring but Impacts on the Next Generation. *Endocrinology* **154**, 2514–2524.

King, V., Hibbert, N., Seckl, J. R., Norman, J. E. and Drake, A. J. (2013b). The effects of an obesogenic diet during pregnancy on fetal growth and placental gene expression are gestation dependent. *Placenta* **34**, 1087–1090.

King, V., Norman, J. E., Seckl, J. R. and Drake, A. J. (2014). Post-weaning diet determines metabolic risk in mice exposed to overnutrition in early life. *Reprod Biol Endocrinol* **12**, 73.

Kjaer, M. M. and Nilas, L. (2013). Pregnancy after bariatric surgery - a review of benefits and risks: Pregnancy after bariatric surgery. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **92**, 264–271.

Kohsaka, A., Laposky, A. D., Ramsey, K. M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Turek, F. W. and Bass, J. (2007). High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metab.* **6**, 414–421.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**, 693–705.

Kovacheva, V. P., Mellott, T. J., Davison, J. M., Wagner, N., Lopez-Coviella, I., Schnitzler, A. C. and Blusztajn, J. K. (2007). Gestational Choline Deficiency Causes Global and Igf2 Gene DNA Hypermethylation by Up-regulation of Dnmt1 Expression. *J. Biol. Chem.* **282**, 31777–31788.

Kwong, W. Y., Wild, A. E., Roberts, P., Willis, A. C. and Fleming, T. P. (2000). Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development* **127**, 4195–4202.

Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T., et al. (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.* **21**, 2672–2681.

Lake, J. K., Power, C. and Cole, T. J. (1997). Child to adult body mass index in the 1958 British birth cohort: associations with parental obesity. *Arch. Dis. Child.* **77**, 376–381.

Lane, R. H., MacLennan, N. K., Hsu, J. L., Janke, S. M. and Pham, T. D. (2002). Increased hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1 gene expression in a rat model of intrauterine growth retardation and subsequent insulin resistance. *Endocrinology* **143**, 2486–2490.

Lane, M., Robker, R. L. and Robertson, S. A. (2014). Parenting from before conception. *Science* **345**, 756–760.

Lecoutre, S. and Breton, C. (2014). The cellularity of offspring's adipose tissue is programmed by maternal nutritional manipulations. *Adipocyte* **3**, 256–262.

Lee, S.-A. and Ding, C. (2012). The dysfunctional placenta epigenome: causes and consequences. *Epigenomics* **4**, 561–569.

Lee, C. Y. W. and Koren, G. (2010). Maternal obesity: Effects on pregnancy and the role of pre-conception counselling. *J. Obstet. Gynaecol.* **30**, 101–106.

Lepercq, J., Timsit, J. and Hauguel-de Mouzon, S. (2000). Etiopathogénie de la macrosomie fœtale. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 29: 6–12.

Lerin, C., Rodgers, J. T., Kalume, D. E., Kim, S., Pandey, A. and Puigserver, P. (2006). GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1α. *Cell Metab.* **3**, 429–438.

Lesseur, C., Armstrong, D. A., Paquette, A. G., Li, Z., Padbury, J. F. and Marsit, C. J. (2014). Maternal obesity and gestational diabetes are associated with placental leptin DNA methylation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **211**, 654.e1–654.e9.

Li, X. and Kazgan, N. (2011). Mammalian sirtuins and energy metabolism. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 575.

Li, M., Sloboda, D. M. and Vickers, M. H. (2011). Maternal Obesity and Developmental Programming of Metabolic Disorders in Offspring: Evidence from Animal Models. *Exp. Diabetes Res.* **2011**, 1–9.

Li, C., Yu, S., Zhong, X., Wu, J. and Li, X. (2012). Transcriptome Comparison between Fetal and Adult Mouse Livers: Implications for Circadian Clock Mechanisms. *PLoS ONE* **7**, e31292.

Li, J., Wang, W., Liu, C., Wang, W., Li, W., Shu, Q., Chen, Z.-J. and Sun, K. (2013). Critical Role of Histone Acetylation by p300 in Human Placental 11β-HSD2 Expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E1189–E1197.

Li, M., Reynolds, C. M., Segovia, S. A., Gray, C. and Vickers, M. H. (2015). Developmental Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Effect of Early Life Nutrition on Susceptibility and Disease Severity in Later Life. *BioMed Res. Int.*

Liang, C., DeCourcy, K. and Prater, M. R. (2010). High–saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism* **59**, 943–950.

Lillycrop, K. A., Phillips, E. S., Jackson, A. A., Hanson, M. A. and Burdge, G. C. (2005). Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J. Nutr.* **135**, 1382–1386.

Lillycrop, K. A., Slater-Jefferies, J. L., Hanson, M. A., Godfrey, K. M., Jackson, A. A. and Burdge, G. C. (2007). Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br. J. Nutr.* **97**, 1064.

Lillycrop, K. A., Phillips, E. S., Torrens, C., Hanson, M. A., Jackson, A. A. and Burdge, G. C. (2008). Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPARα promoter of the offspring. *Br. J. Nutr.* **100**,.

Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M. and Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* **277**, 1659–1662.

Liu, L., Zhen, X. T., Denton, E., Marsden, B. D. and Schapira, M. (2012). ChromoHub: a data hub for navigators of chromatin-mediated signalling. *Bioinformatics* **28**, 2205–2206.

Liu, H.-W., Mahmood, S., Srinivasan, M., Smiraglia, D. J. and Patel, M. S. (2013). Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 1859–1869.

Liu, L., Hong, Z. and Zhang, L. (2015). Associations of prepregnancy body mass index and gestational weight gain with pregnancy outcomes in nulliparous women delivering single live babies. *Sci. Rep.* **5**, 12863.

Locke, A. E., Kahali, B., Berndt, S. I., Justice, A. E., Pers, T. H., Day, F. R., Powell, C., Vedantam, S., Buchkovich, M. L., Yang, J., et al. (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* **518**, 197–206.

Luis, T. C., Killmann, N. M.-B. and Staal, F. J. T. (2012). Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: Introduction to a series of Spotlight Reviews. *Leukemia* **26**, 86–90.

Luzzo, K. M., Wang, Q., Purcell, S. H., Chi, M., Jimenez, P. T., Grindler, N., Schedl, T. and Moley, K. H. (2012). High Fat Diet Induced Developmental Defects in the Mouse: Oocyte Meiotic Aneuploidy and Fetal Growth Retardation/Brain Defects. *PLoS ONE* **7**, e49217.

MacLennan, N. K. (2004). Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol. Genomics* **18**, 43–50.

Mao, J., Zhang, X., Sieli, P. T., Falduto, M. T., Torres, K. E. and Rosenfeld, C. S. (2010). Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 5557–5562.

Marchildon, F., Lala, N., Li, G., St-Louis, C., Lamothe, D., Keller, C. and Wiper-Bergeron, N. (2012). CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta is Expressed in Satellite Cells and Controls Myogenesis. *STEM CELLS* **30**, 2619–2630.

Marmorstein, R. and Zhou, M.-M. (2014). Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a018762–a018762.

Martinez, J. A., Milagro, F. I., Claycombe, K. J. and Schalinske, K. L. (2014). Epigenetics in Adipose Tissue, Obesity, Weight Loss, and Diabetes. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* **5**, 71–81.

Masuyama, H. and Hiramatsu, Y. (2014). Additive Effects of Maternal High Fat Diet during Lactation on Mouse Offspring. *PloS One* **9**, e92805.

Matusiak, K., Barrett, H. L., Callaway, L. K. and Nitert, M. D. (2014). Periconception Weight Loss: Common Sense for Mothers, but What about for Babies? *J. Obes.* **2014**, 1–10.

Mayor, R. S., Finch, K. E., Zehr, J., Morselli, E., Neinast, M. D., Frank, A. P., Hahner, L. D., Wang, J., Rakheja, D., Palmer, B. F., et al. (2015). Maternal high-fat diet is associated with impaired fetal lung development. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **309**, L360–L368.

McAllister, E. J., Dhurandhar, N. V., Keith, S. W., Aronne, L. J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R. M., Biggio, J., Boggiano, M. M., Eisenmann, J. C., et al. (2009). Ten Putative Contributors to the Obesity Epidemic. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 868–913.

McCurdy, C. E., Bishop, J. M., Williams, S. M., Grayson, B. E., Smith, M. S., Friedman, J. E. and Grove, K. L. (2009). Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J. Clin. Invest.*

McGee, S. L., van Denderen, B. J. W., Howlett, K. F., Mollica, J., Schertzer, J. D., Kemp, B. E. and Hargreaves, M. (2008). AMP-Activated Protein Kinase Regulates GLUT4 Transcription by Phosphorylating Histone Deacetylase 5. *Diabetes* **57**, 860–867.

McPherson, N. O., Bakos, H. W., Owens, J. A., Setchell, B. P. and Lane, M. (2013). Improving Metabolic Health in Obese Male Mice via Diet and Exercise Restores Embryo Development and Fetal Growth. *PLoS ONE* **8**, e71459.

McPherson, N. O., Owens, J. A., Fullston, T. and Lane, M. (2015). Preconception diet or exercise intervention in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E805–821.

Mele, J., Muralimanoharan, S., Maloyan, A. and Myatt, L. (2014). Impaired mitochondrial function in human placenta with increased maternal adiposity. *AJP Endocrinol. Metab.* **307**, E419–E425.

Mihaylova, M. M., Vasquez, D. S., Ravnskjaer, K., Denechaud, P.-D., Yu, R. T., Alvarez, J. G., Downes, M., Evans, R. M., Montminy, M. and Shaw, R. J. (2011). Class IIa Histone Deacetylases Are Hormone-Activated Regulators of FOXO and Mammalian Glucose Homeostasis. *Cell* **145**, 607–621.

Mills, J. L., Troendle, J., Conley, M. R., Carter, T. and Druschel, C. M. (2010). Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 1543–1549.

Mischke, M., Pruis, M. G. M., Boekschoten, M. V., Groen, A. K., Fitri, A. R., van de Heijning, B. J. M., Verkade, H. J., MÃ¼ller, M., PlÃ¶sch, T. and Steegenga, W. T. (2013). Maternal Western-Style High Fat Diet Induces Sex-Specific Physiological and Molecular Changes in Two-Week-Old Mouse Offspring. *PLoS ONE* **8**, e78623.

Monk, D. (2015). Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 10.1016/j.biocel.2015.04.014.

Muramatsu-Kato, K., Itoh, H., Kobayashi-Kohmura, Y., Murakami, H., Uchida, T., Suzuki, K., Sugihara, K., Kanayama, N., Tsuchiya, K. J., Takei, N., et al. (2014). Comparison between placental gene expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenases and infantile growth at 10 months of age: Placental 11βHSD and infantile growth. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **40**, 465–472.

Naito, M., Hasegawa, G. and Takahashi, K. (1997). Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc. Res. Tech.* **39**, 350–364.

Nasrin, N., Wu, X., Fortier, E., Feng, Y., Bare', O. C., Chen, S., Ren, X., Wu, Z., Streeper, R. S. and Bordone, L. (2010). SIRT4 Regulates Fatty Acid Oxidation and Mitochondrial Gene Expression in Liver and Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 31995–32002.

Nelissen, E. C. M., van Montfoort, A. P. A., Dumoulin, J. C. M. and Evers, J. L. H. (2011). Epigenetics and the placenta. *Hum. Reprod. Update* **17**, 397–417.

Ng, M. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 766–81.

Ng, S.-F., Lin, R. C. Y., Laybutt, D. R., Barres, R., Owens, J. A. and Morris, M. J. (2010). Chronic high-fat diet in fathers programs β-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* **467**, 963–966.

Nicholas, L. M., Rattanatray, L., MacLaughlin, S. M., Ozanne, S. E., Kleemann, D. O., Walker, S. K., Morrison, J. L., Zhang, S., Muhlhausler, B. S., Martin-Gronert, M. S., et al. (2013a). Differential effects of maternal obesity and weight loss in the periconceptional period on the epigenetic regulation of hepatic insulin-signaling pathways in the offspring. *FASEB J.* **27**, 3786–3796.

Nicholas, L. M., Morrison, J. L., Rattanatray, L., Ozanne, S. E., Kleemann, D. O., Walker, S. K., MacLaughlin, S. M., Zhang, S., Martin-Gronert, M. S. and McMillen, I. C. (2013b). Differential Effects of Exposure to

Maternal Obesity or Maternal Weight Loss during the Periconceptional Period in the Sheep on Insulin Signalling Molecules in Skeletal Muscle of the Offspring at 4 Months of Age. *PLoS ONE* **8**, e84594.

Nicholas, L. M., Rattanatray, L., Morrison, J. L., Kleemann, D. O., Walker, S. K., Zhang, S., MacLaughlin, S. and McMillen, I. C. (2014). Maternal obesity or weight loss around conception impacts hepatic fatty acid metabolism in the offspring: Maternal Obesity and Hepatic Metabolism. *Obesity* **22**, 1685–1693.

Nomura, Y., Lambertini, L., Rialdi, A., Lee, M., Mystal, E. Y., Grabie, M., Manaster, I., Huynh, N., Finik, J., Davey, M., et al. (2014). Global Methylation in the Placenta and Umbilical Cord Blood From Pregnancies With Maternal Gestational Diabetes, Preeclampsia, and Obesity. *Reprod. Sci.* **21**, 131–137.

Novakovic, B., Wong, N. C., Sibson, M., Ng, H.-K., Morley, R., Manuelpillai, U., Down, T., Rakyan, V. K., Beck, S., Hiendleder, S., et al. (2010). DNA Methylation-mediated Down-regulation of DNA Methyltransferase-1 (DNMT1) Is Coincident with, but Not Essential for, Global Hypomethylation in Human Placenta. *J. Biol. Chem.* **285**, 9583–9593.

Oben, J. A., Mouralidarane, A., Samuelsson, A.-M., Matthews, P. J., Morgan, M. L., Mckee, C., Soeda, J., Fernandez-Twinn, D. S., Martin-Gronert, M. S., Ozanne, S. E., et al. (2010). Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J. Hepatol.* 52(6):913–20.

ObEpi-Roche (2012). Enquête épidémiologique ObEpi-Roche sur l'évolution de l'obésité et du surpoids en France.

Oberlander, T. F., Weinberg, J., Papsdorf, M., Grunau, R., Misri, S. and Devlin, A. M. (2008). Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics* **3**, 97–106.

O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S. C., Surani, M. A. and Jenuwein, T. (2001). The Polycomb-Group Gene Ezh2 Is Required for Early Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4330–4336.

O'Dowd, J. F. and Stocker, C. J. (2013). Endocrine pancreatic development: impact of obesity and diet. *Front. Physiol.* **4**,.

Oishi, K., Shirai, H. and Ishida, N. (2005). CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J* **386**, 575–581.

Oken, E., Rifas-Shiman, S. L., Field, A. E., Frazier, A. L. and Gillman, M. W. (2008). Maternal gestational weight gain and offspring weight in adolescence. *Obstet. Gynecol.* **112**, 999.

OMS OMS | Surpoids et obésité de l'enfant. *http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/fr/*.

OMS OMS | Obésité et surpoids. *http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/*.

Oosterveer, M. H. and Schoonjans, K. (2014). Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 1453–1467.

Ozanne, S. E. and Hales, C. N. (2004). Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* **427**, 411–412.

Paden, M. M. and Avery, D. M. (2012). Preconception counseling to prevent the complications of obesity during pregnancy. *Am J Clin Med* **9**, 30–35.

Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S. and Hogenesch, J. B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**, 307–320.

Park, J. H., Stoffers, D. A., Nicholls, R. D. and Simmons, R. A. (2008). Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J. Clin. Invest.*

Patel, R., Williams-Dautovich, J. and Cummins, C. L. (2014). Minireview: New Molecular Mediators of Glucocorticoid Receptor Activity in Metabolic Tissues. *Mol. Endocrinol.* **28**, 999–1011.

Peleg-Raibstein, D., Luca, E. and Wolfrum, C. (2012). Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav. Brain Res.* **233**, 398–404.

Picard, F., Géhin, M., Annicotte, J.-S., Rocchi, S., Champy, M.-F., O'Malley, B. W., Chambon, P. and Auwerx, J. (2002). SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* **111**, 931–941.

Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Roepke, K., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K., et al. (2009). Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome: Nutritionally induced alterations of POMC promoter methylation. *J. Physiol.* **587**, 4963–4976.

Plata, M. del M., Williams, L., Seki, Y., Hartil, K., Kaur, H., Lin, C.-L., Fiallo, A., Glenn, A. S., Katz, E. B., Fuloria, M., et al. (2014). Critical periods of increased fetal vulnerability to a maternal high fat diet. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **12**, 80.

Platt, K. M., Charnigo, R. J. and Pearson, K. J. (2014). Adult offspring of high-fat diet-fed dams can have normal glucose tolerance and body composition. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **5**, 229–239.

Pollock, N. K. (2015). Childhood obesity, bone development, and cardiometabolic risk factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **410**, 52–63.

Portha, B., Fournier, A., Ah Kioon, M. D., Mezger, V. and Movassat, J. (2014). Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. *Biochimie* **97**, 1–15.

Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K. D., Lindner, J., Cherrington, A. D. and Magnuson, M. A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 305–315.

Poston, L. (2012). Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of offspring long term health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 627–639.

Power, M. L. and Schulkin, J. (2013). Maternal regulation of offspring development in mammals is an ancient adaptation tied to lactation. *Appl. Transl. Genomics* **2**, 55–63.

Pruis, M. G. M., Lendvai, á., Bloks, V. W., Zwier, M. V., Baller, J. F. W., de Bruin, A., Groen, A. K. and Plösch, T. (2014). Maternal western diet primes non-alcoholic fatty liver disease in adult mouse offspring. *Acta Physiol.* **210**, 215–227.

Purcell, R. H., Sun, B., Pass, L. L., Power, M. L., Moran, T. H. and Tamashiro, K. L. K. (2011). Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol. Behav.* **104**, 474–479.

Purushotham, A., Schug, T. T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X. and Li, X. (2009). Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab.* **9**, 327–338.

Rajasingam, D., Seed, P. T., Briley, A. L., Shennan, A. H. and Poston, L. (2009). A prospective study of pregnancy outcome and biomarkers of oxidative stress in nulliparous obese women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **200**, 395.e1–395.e9.

Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B., Pérusse, L. and Bouchard, C. (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* **14**, 529–644.

Ratajczak, C. K., Herzog, E. D. and Muglia, L. J. (2010). Clock gene expression in gravid uterus and extra-embryonic tissues during late gestation in the mouse. *Reprod. Fertil. Dev.* **22**, 743.

Rattanatray, L., MacLaughlin, S. M., Kleemann, D. O., Walker, S. K., Muhlhausler, B. S. and McMillen, I. C. (2010). Impact of Maternal Periconceptional Overnutrition on Fat Mass and Expression of Adipogenic and Lipogenic Genes in Visceral and Subcutaneous Fat Depots in the Postnatal Lamb. *Endocrinology* **151**, 5195–5205.

Rattanatray, L., Muhlhausler, B. S., Nicholas, L. M., Morrison, J. L. and McMillen, I. C. (2014). Impact of maternal overnutrition on gluconeogenic factors and methylation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter in the fetal and postnatal liver. *Pediatr. Res.* **75**, 14–21.

Ravelli, G.-P., Stein, Z. A. and Susser, M. W. (1976). Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. *N. Engl. J. Med.* **295**, 349–353.

Ravelli, A. C., van der Meulen, J. H., Osmond, C., Barker, D. J. and Bleker, O. P. (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 811–816.

Raychaudhuri, N., Raychaudhuri, S., Thamotharan, M. and Devaskar, S. U. (2008). Histone Code Modifications Repress Glucose Transporter 4 Expression in the Intrauterine Growth-restricted Offspring. *J. Biol. Chem.* **283**, 13611–13626.

Razin, A., Webb, C., Szyf, M., Yisraeli, J., Rosenthal, A., Naveh-Many, T., Sciaky-Gallili, N. and Cedar, H. (1984). Variations in DNA methylation during mouse cell differentiation in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 2275–2279.

Reynolds, R. M., Allan, K. M., Raja, E. A., Bhattacharya, S., McNeill, G., Hannaford, P. C., Sarwar, N., Lee, A. J., Bhattacharya, S. and Norman, J. E. (2013). Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring: follow-up of 1 323 275 person years. *BMJ* **347**, f4539–f4539.

Rezaee, F. (2013). Role of Adipose Tissue in Metabolic System Disorders. *J. Diabetes Metab.* **01**,.

Risnes, K. R., Romundstad, P. R., Nilsen, T. I. L., Eskild, A. and Vatten, L. J. (2009). Placental Weight Relative to Birth Weight and Long-term Cardiovascular Mortality: Findings From a Cohort of 31,307 Men and Women. *Am. J. Epidemiol.* **170**, 622–631.

Roberts, V. H. J., Frias, A. E. and Grove, K. L. (2015). Impact of Maternal Obesity on Fetal Programming of Cardiovascular Disease. *Physiology* **30**, 224–231.

Robker, R. L., Akison, L. K., Bennett, B. D., Thrupp, P. N., Chura, L. R., Russell, D. L., Lane, M. and Norman, R. J. (2009). Obese Women Exhibit Differences in Ovarian Metabolites, Hormones, and Gene Expression Compared with Moderate-Weight Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 1533–1540.

Rodgers, J. T. and Puigserver, P. (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12861–12866.

Rodgers, J. T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z. and Puigserver, P. (2008). Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett.* **582**, 46–53.

Roeder, L. M. and Chow, B. F. (1972). Maternal undernutrition and its long-term effects on the offspring. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**, 812–821.

Rosario, F. J., Kanai, Y., Powell, T. L. and Jansson, T. (2015). Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth: Maternal Obesity and Placental Nutrient Transport. *Obesity* **23**, 1663–1670.

Ross, M. G. and Desai, M. (2014). Developmental Programming of Appetite/Satiety. *Ann. Nutr. Metab.* **64**, 36–44.

Rossant, J. and Cross, J. C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet* Vol. 2(7): 538–48.

Rossant, J., Sanford, J. P., Chapman, V. M. and Andrews, G. K. (1986). Undermethylation of structural gene sequences in extraembryonic lineages of the mouse. *Dev. Biol.* **117**, 567–573.

Roth, S. Y., Denu, J. M. and Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81–120.

Ruchat, S.-M., Houde, A.-A., Voisin, G., St-Pierre, J., Perron, P., Baillargeon, J.-P., Gaudet, D., Hivert, M.-F., Brisson, D. and Bouchard, L. (2013). Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics* **8**, 935–943.

Rugg-Gunn, P. J. (2012). Epigenetic features of the mouse trophoblast. *Reprod. Biomed. Online* **25**, 21–30.

Rugg-Gunn, P. J., Cox, B. J., Ralston, A. and Rossant, J. (2010). Distinct histone modifications in stem cell lines and tissue lineages from the early mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 10783–10790.

Ruzov, A., Tsenkina, Y., Serio, A., Dudnakova, T., Fletcher, J., Bai, Y., Chebotareva, T., Pells, S., Hannoun, Z., Sullivan, G., et al. (2011). Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res.* **21**, 1332–1342.

Saben, J., Lindsey, F., Zhong, Y., Thakali, K., Badger, T. M., Andres, A., Gomez-Acevedo, H. and Shankar, K. (2014). Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. *Placenta* **35**, 171–177.

Saffery, R. and Novakovic, B. (2014). Epigenetics as the mediator of fetal programming of adult onset disease: what is the evidence? *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **93**, 1090–1098.

Sahu, A. (2003). Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front. Neuroendocrinol.* **24**, 225–253.

Salbaum, J. M., Kruger, C., Zhang, X., Delahaye, N. A., Pavlinkova, G., Burk, D. H. and Kappen, C. (2011). Altered gene expression and spongiotrophoblast differentiation in placenta from a mouse model of diabetes in pregnancy. *Diabetologia* **54**, 1909–1920.

Samuelsson, A.-M., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H. J. M., Piersma, A. H., Ozanne, S. E., Twinn, D. F., Remacle, C., et al. (2008). Diet-Induced Obesity in Female Mice Leads to Offspring Hyperphagia, Adiposity, Hypertension, and Insulin Resistance: A Novel Murine Model of Developmental Programming. *Hypertension* **51**, 383–392.

Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. and Dean, W. (2002). Dynamic Reprogramming of DNA Methylation in the Early Mouse Embryo. *Dev. Biol.* **241**, 172–182.

Sarmento, O. F. (2004). Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *J. Cell Sci.* **117**, 4449–4459.

Sasaki, K. and Sonoda, Y. (2000). Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo. *Arch Histol Cytol* 63(2):137–46.

Sasaki, A., de Vega, W., Sivanathan, S., St-Cyr, S. and McGowan, P. O. (2014). Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience* **272**, 92–101.

Sasson, I. E., Vitins, A. P., Mainigi, M. A., Moley, K. H. and Simmons, R. A. (2015). Pre-gestational vs gestational exposure to maternal obesity differentially programs the offspring in mice. *Diabetologia* **58**, 615–624.

Savastano, S., Di Somma, C., Colao, A., Barrea, L., Orio, F., Finelli, C., Pasanisi, F., Contaldo, F. and Tarantino, G. (2015). Preliminary data on the relationship between circulating levels of Sirtuin 4, anthropometric and metabolic parameters in obese subjects according to growth hormone/insulin-like growth factor-1 status. *Growth Horm. IGF Res.* **25**, 28–33.

Schroeder, D. I., Blair, J. D., Lott, P., Yu, H. O. K., Hong, D., Crary, F., Ashwood, P., Walker, C., Korf, I., Robinson, W. P., et al. (2013). The human placenta methylome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6037–6042.

Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature* **517**, 321–326.

Schulz, L. C. (2010). The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 16757–16758.

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J. and Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661–671.

Schwer, B., Schumacher, B., Lombard, D. B., Xiao, C., Kurtev, M. V., Gao, J., Schneider, J. I., Chai, H., Bronson, R. T., Tsai, L.-H., et al. (2010). Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 21790–21794.

Sedlmeier, E.-M., Brunner, S., Much, D., Pagel, P., Ulbrich, S. E., Meyer, H. H., Amann-Gassner, U., Hauner, H. and Bader, B. L. (2014). Human placental transcriptome shows sexually dimorphic gene expression and responsiveness to maternal dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intervention during pregnancy. *BMC Genomics* **15**, 941.

Serón-Ferré, M., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Valenzuela, F. J., Reynolds, H. E., Llanos, A. J., Rojas, A., Valenzuela, G. J. and Torres-Farfan, C. (2012). Circadian rhythms in the fetus. *Mol. Cell. Endocrinol.* **349**, 68–75.

Seto, E. and Yoshida, M. (2014). Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a018713–a018713.

Sferruzzi-Perri, A. N., Vaughan, O. R., Haro, M., Cooper, W. N., Musial, B., Charalambous, M., Pestana, D., Ayyar, S., Ferguson-Smith, A. C., Burton, G. J., et al. (2013). An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory. *FASEB J.* **27**, 3928–3937.

Shankar, K., Harrell, A., Liu, X., Gilchrist, J. M., Ronis, M. J. J. and Badger, T. M. (2008). Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R528–R538.

Shirakawa, K., Chavez, L., Hakre, S., Calvanese, V. and Verdin, E. (2013). Reactivation of Latent HIV by Histone Deacetylase Inhibitors. *Trends in Microbiology* 21, no. **6**: 277–85.

Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P. and Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Dev. Cell* **18**, 175–189.

Smith, J., Cianflone, K., Biron, S., Hould, F. S., Lebel, S., Marceau, S., Lescelleur, O., Biertho, L., Simard, S., Kral, J. G., et al. (2009). Effects of Maternal Surgical Weight Loss in Mothers on Intergenerational Transmission of Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 4275–4283.

Sood, R., Zehnder, J. L., Druzin, M. L. and Brown, P. O. (2006). Gene expression patterns in human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5478–5483.

Sookoian, S., Gemma, C., Gianotti, T. F., Burgueño, A., Castaño, G. and Pirola, C. J. (2008). Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 1606–1615.

Sookoian, S., Rosselli, M. S., Gemma, C., Burgueño, A. L., Fernández Gianotti, T., Castaño, G. O. and Pirola, C. J. (2010). Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Impact of liver methylation of the peroxisome proliferator–activated receptor γ coactivator 1α promoter. *Hepatology* **52**, 1992–2000.

Sookoian, S., Gianotti, T. F., Burgueño, A. L. and Pirola, C. J. (2013). Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a systems biology approach. *Pediatr. Res.* **73**, 531–542.

Srinivasan, M. (2005). Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *AJP Endocrinol. Metab.* **290**, E129–E134.

Stanton, M. C., Chen, S.-C., Jackson, J. V., Rojas-Triana, A., Kinsley, D., Cui, L., Fine, J. S., Greenfeder, S., Bober, L. A. and Jenh, C.-H. (2011). Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *J Inflamm Lond* **8**,.

Stocker, C. J. and Cawthorne, M. A. (2008). The influence of leptin on early life programming of obesity. *Trends Biotechnol.* **26**, 545–551.

Stöger, R. (2008). Epigenetics and obesity. *Pharmacogenomics* **9**, 1851–1860.

Strakovsky, R. S., Zhang, X., Zhou, D. and Pan, Y.-X. (2011). Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats: Programming gluconeogenesis by gestational high fat diet. *J. Physiol.* **589**, 2707–2717.

Street, M. E., Viani, I., Ziveri, M. A., Volta, C., Smerieri, A. and Bernasconi, S. (2011). Impairment of insulin receptor signal transduction in placentas of intra-uterine growth-restricted newborns and its relationship with fetal growth. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* **164**, 45–52.

Struwe, E., Berzl, G. M., Schild, R. L., Beckmann, M. W., Dörr, H. G., Rascher, W. and Dötsch, J. (2007). Simultaneously reduced gene expression of cortisol-activating and cortisol-inactivating enzymes in placentas of small-for-gestational-age neonates. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **197**, 43.e1–43.e6.

Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H. and Tajima, S. (2004). DNMT3L Stimulates the DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a Direct Interaction. *J. Biol. Chem.* **279**, 27816–27823.

Sugii, S. and Evans, R. M. (2011). Epigenetic codes of PPARγ in metabolic disease. *FEBS Lett.* **585**, 2121–2128.

Sullivan, E. L., Riper, K. M., Lockard, R. and Valleau, J. C. (2015). Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior. *Horm. Behav.*

Sun, C., Fan, J.-G. and Qiao, L. (2015). Potential Epigenetic Mechanism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 5161–5179.

Suter, M., Bocock, P., Showalter, L., Hu, M., Shope, C., McKnight, R., Grove, K., Lane, R. and Aagaard-Tillery, K. (2011). Epigenomics: maternal high-fat diet exposure in utero disrupts peripheral circadian gene expression in nonhuman primates. *FASEB J.* **25**, 714–726.

Suter, M. A., Chen, A., Burdine, M. S., Choudhury, M., Harris, R. A., Lane, R. H., Friedman, J. E., Grove, K. L., Tackett, A. J. and Aagaard, K. M. (2012). A maternal high-fat diet modulates fetal SIRT1 histone and protein deacetylase activity in nonhuman primates. *FASEB J.* **26**, 5106–5114.

Suter, M. A., Ma, J., Vuguin, P. M., Hartil, K., Fiallo, A., Harris, R. A., Charron, M. J. and Aagaard, K. M. (2014). In utero exposure to a maternal high-fat diet alters the epigenetic histone code in a murine model. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **210**, 463.e1–463.e11.

Sutton, G. M., Centanni, A. V. and Butler, A. A. (2010). Protein Malnutrition during Pregnancy in C57BL/6J Mice Results in Offspring with Altered Circadian Physiology before Obesity. *Endocrinology* **151**, 1570–1580.

Swanson, A. M. and David, A. L. (2015). Animal models of fetal growth restriction: Considerations for translational medicine. *Placenta* **36**, 623–630.

Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., et al. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* **16**, 1779–1791.

Takaya, J., Iharada, A., Okihana, H. and Kaneko, K. (2013). A calcium-deficient diet in pregnant, nursing rats induces hypomethylation of specific cytosines in the 11β-hydroxysteroid dehydrogenase-1 promoter in pup liver. *Nutr. Res.* **33**, 961–970.

Tanaka, S., Nakanishi, M. O. and Shiota, K. (2014). DNA methylation and its role in the trophoblast cell lineage. *Int. J. Dev. Biol.* **58**, 231–238.

Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D., Aubrière, M.-C., Peynot, N., Dahirel, M., Bertrand-Michel, J., Aguirre-Lavin, T., Morel, O., Beaujean, N., Duranthon, V., et al. (2013). Sexual Dimorphism of the Feto-Placental Phenotype in Response to a High Fat and Control Maternal Diets in a Rabbit Model. *PLoS ONE* **8**, e83458.

Tarrade, A., Panchenko, P., Junien, C. and Gabory, A. (2015). Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *J. Exp. Biol.* **218**, 50–58.

Taylor, P. D. and Poston, L. (2007). Developmental programming of obesity in mammals: Developmental programming of obesity. *Exp. Physiol.* **92**, 287–298.

Tessier, D. R., Ferraro, Z. M. and Gruslin, A. (2013). Role of leptin in pregnancy: Consequences of maternal obesity. *Placenta* **34**, 205–211.

Thornburg, K. L. (2015). The programming of cardiovascular disease. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **6**, 366–376.

Thornburg, K. L., O'Tierney, P. F. and Louey, S. (2010). Review: The Placenta is a Programming Agent for Cardiovascular Disease. *Placenta* **31**, S54–S59.

Tobi, E. W., Lumey, L. H., Talens, R. P., Kremer, D., Putter, H., Stein, A. D., Slagboom, P. E. and Heijmans, B. T. (2009). DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4046–4053.

Togher, K. L., Togher, K. L., O'Keeffe, M. M., O'Keeffe, M. M., Khashan, A. S., Khashan, A. S., Gutierrez, H., Gutierrez, H., Kenny, L. C., Kenny, L. C., et al. (2014). Epigenetic regulation of the placental HSD11B2 barrier and its role as a critical regulator of fetal development. *Epigenetics* **9**, 816–822.

Tuersunjiang, N., Odhiambo, J. F., Long, N. M., Shasa, D. R., Nathanielsz, P. W. and Ford, S. P. (2013). Diet reduction to requirements in obese/overfed ewes from early gestation prevents glucose/insulin dysregulation and returns fetal adiposity and organ development to control levels. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E868–878.

Turek, F. W. (2005). Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science* **308**, 1043–1045.

Turek-Plewa, J. and Jagodzinski, P. P. (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **10**, 631.

Turner, N. (2013). Mitochondrial Metabolism and Insulin Action. In *Type 2 Diabetes*, edited by Kazuko Masuo. InTech.

Tycko, B. (2006). Imprinted genes in placental growth and obstetric disorders. *Cytogenet. Genome Res.* **113**, 271–278.

Vaiman, D., Gascoin-Lachambre, G., Boubred, F., Mondon, F., Feuerstein, J.-M., Ligi, I., Grandvuillemin, I., Barbaux, S., Ghigo, E., Achard, V., et al. (2011). The Intensity of IUGR-Induced Transcriptome Deregulations Is Inversely Correlated with the Onset of Organ Function in a Rat Model. *PLoS ONE* **6**, e21222.

Vaiman, D., Calicchio, R. and Miralles, F. (2013). Landscape of Transcriptional Deregulations in the Preeclamptic Placenta. *PLoS ONE* 8(6): e65498.

van der Krieken, S. E., Popeijus, H. E., Mensink, R. P. and Plat, J. (2015). CCAAT/Enhancer Binding Protein β in relation to ER Stress, Inflammation, and Metabolic Disturbances. *BioMed Res. Int.* **2015**, 1–13.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, research0034.

Vega, C. C., Reyes-Castro, L. A., Bautista, C. J., Larrea, F., Nathanielsz, P. W. and Zambrano, E. (2015). Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *Int. J. Obes.* **39**, 712–719.

Vickers, M. H., Clayton, Z. E., Yap, C. and Sloboda, D. M. (2011). Maternal Fructose Intake during Pregnancy and Lactation Alters Placental Growth and Leads to Sex-Specific Changes in Fetal and Neonatal Endocrine Function. *Endocrinology* **152**, 1378–1387.

Villamor, E. and Cnattingius, S. (2006). Interpregnancy weight change and risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study. *The Lancet* **368**, 1164–1170.

Vucetic, Z., Kimmel, J., Totoki, K., Hollenbeck, E. and Reyes, T. M. (2010). Maternal High-Fat Diet Alters Methylation and Gene Expression of Dopamine and Opioid-Related Genes. *Endocrinology* **151**, 4756–4764.

Waddell, B. J., Wharfe, M. D., Crew, R. C. and Mark, P. J. (2012). A rhythmic placenta? Circadian variation, clock genes and placental function. *Placenta* **33**, 533–539.

Wang, Y. (2010). Vascular Biology of the Placenta. *Colloq. Ser. Integr. Syst. Physiol. Mol. Funct.* **2**, 1–98.

Wang, Z., Qi, C., Krones, A., Woodring, P., Zhu, X., Reddy, J. K., Evans, R. M., Rosenfeld, M. G. and Hunter, T. (2006). Critical roles of the p160 transcriptional coactivators p/CIP and SRC-1 in energy balance. *Cell Metab.* **3**, 111–122.

Wang, F., Liu, H., Blanton, W. P., Belkina, A., Lebrasseur, N. K. and Denis, G. V. (2010). *Brd2* disruption in mice causes severe obesity without Type 2 diabetes. *Biochem. J.* **425**, 71–83.

Wang, F., Deeney, J. T. and Denis, G. V. (2013). Brd2 Gene Disruption Causes "Metabolically Healthy" Obesity. In *Vitamins & Hormones*, pp. 49–75. Elsevier.

Wang, X., Lacza, Z., Sun, Y. E. and Han, W. (2014). Leptin resistance and obesity in mice with deletion of methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) in hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) neurons. *Diabetologia* **57**, 236–245.

Ward Platt, M. and Deshpande, S. (2005). Metabolic adaptation at birth. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* **10**, 341–350.

Waterland, R. A. and Michels, K. B. (2007). Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 363–388.

Watson, E. D. (2005). Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta. *Physiology* **20**, 180–193.

Weaver, I. C. G., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M. and Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* **7**, 847–854.

Weber, E. M., Algers, B., Würbel, H., Hultgren, J. and Olsson, I. a. S. (2013). Influence of Strain and Parity on the Risk of Litter Loss in Laboratory Mice. *Reprod. Domest. Anim.* **48**,.

Wei, Y., Yang, C.-R., Wei, Y.-P., Ge, Z.-J., Zhao, Z.-A., Zhang, B., Hou, Y., Schatten, H. and Sun, Q.-Y. (2015). Enriched Environment-induced Maternal Weight Loss Reprograms Metabolic Gene Expression in Mouse Offspring. *J. Biol. Chem.* **290**, 4604–4619.

Weiskirchen, R. and Tacke, F. (2014). Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* **3**, 344.

Weisman, C. S., Misra, D. P., Hillemeier, M. M., Downs, D. S., Chuang, C. H., Camacho, F. T. and Dyer, A.-M. (2011). Preconception Predictors of Birth Outcomes: Prospective Findings from the Central Pennsylvania Women's Health Study. *Matern. Child Health J.* **15**, 829–835.

Wharfe, M. D., Mark, P. J. and Waddell, B. J. (2011). Circadian Variation in Placental and Hepatic Clock Genes in Rat Pregnancy. *Endocrinology* **152**, 3552–3560.

Whitaker, R. C. (2004). Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics* **114**, e29–e36.

White, C. L., Purpera, M. N. and Morrison, C. D. (2009). Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**, R1464–R1472.

Whitehead, J. P., Richards, A. A., Hickman, I. J., Macdonald, G. A. and Prins, J. B. (2006). Adiponectin - a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes. Metab.* **8**, 264–280.

Williams, L., Seki, Y., Vuguin, P. M. and Charron, M. J. (2014). Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1842**, 507–519.

Wood-Bradley, R., Barrand, S., Giot, A. and Armitage, J. (2015). Understanding the Role of Maternal Diet on Kidney Development; an Opportunity to Improve Cardiovascular and Renal Health for Future Generations. *Nutrients* **7**, 1881–1905.

World Gastroenterology Organisation (2012). Stéatose hépatique non alcooloque.

Wu, L. L.-Y., Dunning, K. R., Yang, X., Russell, D. L., Lane, M., Norman, R. J. and Robker, R. L. (2010). High-Fat Diet Causes Lipotoxicity Responses in Cumulus–Oocyte Complexes and Decreased Fertilization Rates. *Endocrinology* **151**, 5438–5445.

Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y. and Fukamizu, A. (2008). Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol. Cell* **32**, 221–231.

Yang, J. and Young, M. J. (2009). The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *J. Mol. Endocrinol.* **43**, 53–64.

Yazdi, F. T., Clee, S. M. and Meyre, D. (2015). Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. *PeerJ* **3**, e856.

Yoo, E. J., Chung, J.-J., Choe, S. S., Kim, K. H. and Kim, J. B. (2006). Down-regulation of Histone Deacetylases Stimulates Adipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* **281**, 6608–6615.

Yoshizawa, T., Karim, M. F., Sato, Y., Senokuchi, T., Miyata, K., Fukuda, T., Go, C., Tasaki, M., Uchimura, K., Kadomatsu, T., et al. (2014). SIRT7 Controls Hepatic Lipid Metabolism by Regulating the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cell Metab.* **19**, 712–721.

Yu, J. and Auwerx, J. (2009). The Role of Sirtuins in the Control of Metabolic Homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1173**, E10–E19.

Zambrano, E., Martínez-Samayoa, P. M., Rodríguez-González, G. L. and Nathanielsz, P. W. (2010). RAPID REPORT: Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats: Dietary intervention to reverse metabolic programming outcomes. *J. Physiol.* **588**, 1791–1799.

Zeileis, A. and Hothorn, T. (2002). Diagnostic Checking in Regression Relationships. *R News* **2**, 7–10.

Zeileis, A., Wiel, M. A., Hornik, K. and Hothorn, T. (2008). Implementing a class of permutation tests: The coin package. *J. Stat. Softw.* **28**, 1–23.

Zhang, S., Rattanatray, L., Morrison, J. L., Nicholas, L. M., Lie, S. and McMillen, I. C. (2011). Maternal Obesity and the Early Origins of Childhood Obesity: Weighing Up the Benefits and Costs of Maternal Weight Loss in the Periconceptional Period for the Offspring. *Exp. Diabetes Res.* **2011**, 1–10.

Zhang, S., Regnault, T., Barker, P., Botting, K., McMillen, I., McMillan, C., Roberts, C. and Morrison, J. (2015). Placental Adaptations in Growth Restriction. *Nutrients* **7**, 360–389.

Zheng, S., Rollet, M. and Pan, Y.-X. (2011). Maternal protein restriction during pregnancy induces CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBPβ) expression through the regulation of histone modification at its promoter region in female offspring rat skeletal muscle. *Epigenetics* **6**, 161–170.

Zhou, X. Y., Shibusawa, N., Naik, K., Porras, D., Temple, K., Ou, H., Kaihara, K., Roe, M. W., Brady, M. J. and Wondisford, F. E. (2004). Insulin regulation of hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein. *Nat. Med.* **10**, 633–637.

Zorn, A. M. and Wells, J. M. (2007). Molecular Basis of Vertebrate Endoderm Development. In *International Review of Cytology*, pp. 49–111. Elsevier.

Zorn, A. M. and Wells, J. M. (2009). Vertebrate Endoderm Development and Organ Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 221–251.

ARTICLES 3 à 8

3) **Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice**. Elena N. Makarova, Elena V. Chepeleva, Polina E. Panchenko, and Nadezhda M. Bazhan. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2013) 305: R1268–R1280

4) **Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism.** Anne Tarrade, Polina Panchenko, Claudine Junien and Anne Gabory. *The Journal of Experimental Biology* (2015) 218, 50-58 doi:10.1242/jeb.110320

5) **Epigénétique et Nutrition : impacts de l'alimentation maternelle sur le développement placentaire et la santé de la descendance**. Polina E. Panchenko, Marion Lemaire, Sara Fneich, Sarah Voisin, Mélanie Jouin, Claudine Junien et Anne Gabory. *Biologie Aujourd'hui* (2015) 409 (2), 1-13

6) **Chapter 20. Sexual Dimorphism and DOHaD through the Lens of Epigenetics: Genetic, Ancestral, Developmental, and Environmental Origins from Previous to the Next Generation(s).** Claudine Junien, Sara Fneich, Polina Panchenko, Sarah Voisin, Anne Gabory. *Book - The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease*. pp 389-424 (2015)

7) **Le nouveau paradigme de l'Origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD), Epigénétique, Environnement : preuves et chaînons manquants.** Claudine Junien, Polina Panchenko, Luciano Pirola, Valérie Amarger, Bertrand Kaeffer, Patricia Parnet, Jérôme Torrisani, Francisco Bolaños Jimenez, Hélène Jammes, Anne Gabory *Médecine/Sciences* (*In press*)

8) **Epigénétique et réponses transgénérationnelles aux impacts de l'environnement : des faits aux lacunes.** Claudine Junien, Polina Panchenko, Sara Fneich, Luciano Pirola, Sabrina Chriett, Valérie Amarger, Bertrand Kaeffer, Patricia Parnet, Jérome Torrisani, Francisco Bolaños Jimenez, Hélène Jammes, Anne Gabory. *Médecine/Sciences* (*In press*)

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 305: R1268–R1280, 2013.
First published October 2, 2013; doi:10.1152/ajpregu.00162.2013.

CALL FOR PAPERS | *Fetal and Neonatal Programming: Epigenetic Modification of Phenotype*

Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice

Elena N. Makarova, Elena V. Chepeleva, Polina E. Panchenko, and Nadezhda M. Bazhan

Laboratory of Physiological Genetics, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Submitted 3 April 2013; accepted in final form 27 September 2013

Makarova EN, Chepeleva EV, Panchenko PE, Bazhan NM. Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305: R1268–R1280, 2013. First published October 2, 2013; doi:10.1152/ajpregu.00162.2013.—Maternal obesity increases the risk of obesity in offspring, and obesity is accompanied by an increase in blood leptin levels. The "yellow" mutation at the mouse agouti locus (A^y) increases blood leptin levels in C57BL preobese pregnant mice without affecting other metabolic characteristics. We investigated the influence of the A^y mutation or leptin injection at the end of pregnancy in C57BL mice on metabolic phenotypes and the susceptibility to diet-induced obesity (DIO) in offspring. In both C57BL-A^y and leptin-treated mice, the maternal effect was more pronounced in male offspring. Compared with males born to control mothers, males born to A^y mothers displayed equal food intake (FI) but decreased body weight (BW) gain after weaning, equal glucose tolerance, and enhanced FI-to-BW ratios on the standard diet but the same FI and BW on the high-fat diet. Males born to A^y mothers were less responsive to the anorectic effect of exogenous leptin and less resistant to fasting (were not hyperphagic and gained less weight during refeeding after food deprivation) compared with males born to control mothers. However, all progeny displayed equal hypothalamic expression of Agouti gene-related protein (AgRP), neuropeptide Y (NPY), and proopiomelanocortin (POMC) and equal plasma leptin and glucose levels after food deprivation. Leptin injections in C57BL mice on *day 17* of pregnancy decreased BW in both male and female offspring but inhibited FI and DIO only in male offspring. Our results show that hyperleptinemia during pregnancy has sex-specific long-term effects on energy balance regulation in progeny and does not predispose offspring to developing obesity.

leptin; pregnancy; developmental programming; mice; high-fat diet

BECAUSE OF THE OBESITY EPIDEMIC, the influence of intrauterine and early postnatal conditions on the metabolic phenotypes of individuals later in life has gained increasing attention. Experimental and clinical investigations have shown that maternal obesity during pregnancy increases the risk of the offspring developing obesity (29, 39, 42). Obesity is characterized by elevated levels of leptin in both nonpregnant and pregnant females (23, 30, 33). The adipocyte cytokine leptin plays a key role in energy homeostasis regulation (22), and circulating leptin levels are proportional to the body adipose mass (13).

Address for reprint requests and other correspondence: E. N. Makarova, Inst. of Cytology and Genetics, Prospekt Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090, Russia (e-mail: enmakarova@gmail.com).

A considerable number of studies have identified leptin as a potential programming factor (48). In experimental animal models, expression of the leptin receptor has been detected in various fetal tissues, including cartilage, bone, lung, brain (16), and pancreas (18). Leptin has been shown to activate the differentiation and proliferation of fetal chondrocytes, osteoblasts (2), and islet cells (18) and to promote the migration and differentiation of hypothalamic neural progenitor cells (8). In addition, leptin may influence fetal development by affecting nutrient transport across the placenta (20, 49). Leptin administration to pregnant dams has been shown to affect mouse fetal growth (53) and rat progeny phenotypes in postnatal life (32). Taken together, these data suggest that maternal leptin levels during pregnancy may contribute to fetal developmental programming. However, whether maternal hyperleptinemia during pregnancy is a key factor involved in promoting the development of obesity in offspring remains unclear.

Both malnutrition and maternal obesity in pregnancy have been shown to predispose the offspring to becoming obese (25), although malnutrition is characterized by a decrease in blood leptin levels (21) while obesity is characterized by an increase in leptin levels. Obesity is associated with hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hyperlipidemia, which may also have programming effects (5, 12, 15).

The results obtained in experiments administering leptin to pregnant mice or rats have been conflicting. Leptin infusion in food-restricted mice during early and midpregnancy promoted development of diet-induced obesity (DIO) in adult female offspring (36); however, the administration of leptin to both protein-restricted and adequately fed rats during the third trimester and lactation protected offspring from obesity induced by high-fat feeding (43, 44). However, in the latter experiments, the rats received leptin during both pregnancy and lactation. Previous reports suggest that maternal leptin may be transferred to the infant via milk (46). In neonates, leptin was shown to promote the formation of the neural network related to food intake (FI) (3), and neonatal leptin supplementation in rats prevented obesity later in life (37), whereas specific leptin blockage increased the susceptibility to DIO (1). Therefore, it remains unknown whether prenatal or postnatal maternal hyperleptinemia is responsible for the antiobesity effects of leptin administration during late pregnancy and lactation (43, 44).

The aim of this study was to investigate the influence of chronic maternal hyperleptinemia during pregnancy on meta-

 0363-6119/13 Copyright © 2013 the American Physiological Society

bolic phenotypes and susceptibility to DIO of the progeny and to reveal the role of the late prenatal stage in causing possible programming effects of maternal leptin. To answer these questions, we used mice with inherited hyperleptinemia during pregnancy and administered leptin to the mice at the end of pregnancy. The "yellow" mutation at the mouse agouti locus (A^y) causes ectopic overexpression of the agouti gene (4), which disturbs energy balance regulation via chronic blockage of melanocortin receptors by the agouti protein in the hypothalamus (28) and results in a yellow coat and the development of obesity and diabetes with age (52). Previously, we have shown that C57BL female mice with the "yellow" mutation (A^y/a) mated with males at the preobese stage display metabolic characteristics (blood levels of corticosterone, glucose, and insulin and glucose and insulin tolerance) during pregnancy and lactation that are similar to those of C57BL mice with the standard agouti genotype (*a/a*). The only difference between mated A^y/a and *a/a* mice is that A^y/a mice express blood leptin levels that are approximately two times higher during pregnancy. In suckling A^y/a and *a/a* mice, the leptin levels are equal (27). Therefore, this model imitates the hyperleptinemia resulting from obesity and allows us to separate the programming effects caused by elevated leptin levels from the effects of other metabolic abnormalities that are associated with obesity, and this effect is restricted to pregnancy only. We also examined whether single leptin injections in pregnant *a/a* C57BL/6J mice at the end of pregnancy influence susceptibility to DIO in the offspring.

We found that female progeny were unaffected by the maternal genotype, but compared with the male progeny of the control mothers the male progeny of the A^y mothers displayed a decreased growth rate after weaning, an enhanced ratio of energy intake (EI) to body weight (BW) in maturity, decreased sensitivity to exogenous leptin, decreased resistance to food deprivation, and equal EI and BW during high-fat diet feeding. Similar to offspring of the A^y mice, female offspring were less affected by the administration of leptin to mothers than male offspring. The administration of leptin to pregnant dams at the end of pregnancy inhibited obesity in male offspring without affecting female offspring on a palatable fat and sweet diet. The data suggest that hyperleptinemia during pregnancy has sex-specific long-term effects on energy balance regulation in the progeny and does not predispose the offspring to obesity.

METHODS

Ethical Approval

All experiments were performed according to the highest standards of humane animal care with International European ethical standards (86/609-EEC) and Russian national instructions for the care and use of laboratory animals. The protocols were reviewed and approved by the Independent Ethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics (Siberian Division, Russian Academy of Sciences).

Diets

The standard chow diet in pelleted form provided 3.7 kcal/g and contained 19% protein, 4% fat, and 66% carbohydrates, and the high-fat diet provided 4.8 kcal/g and contained 24% protein, 24% fat, and 42% carbohydrates. Both diets were purchased from Assortiment Agro (Moscow region, Turacovo, Russia).

Palatable food included sweet butter biscuits, lard, and sunflower seeds. The animals received palatable food in addition to standard chow. The animals received excess quantities of each foodstuff including the chow, such that their intake was ad libitum.

Animals: Genetic Model

C57BL/6J mice with the agouti genotypes A^y/a and *a/a* were bred in the vivarium of the Institute of Cytology and Genetics. The mice were housed under a 12:12-h light-dark regime (with lights switched off at 1800) at an ambient temperature of 22°C. The mice were provided access to commercial mouse chow and water ad libitum.

At 8 wk of age, females were mated with males in reciprocal crosses ($A^y/a \times a/a$ and $a/a \times A^y/a$) and the presence of the copulatory plug was checked. Mated females were housed individually from the day of plug detection (*day 1* of pregnancy). The mated females were monitored to record parturition and the number of pups, and the day of delivery was designated as *postpartum day 1*. To measure plasma leptin concentrations, 19 *a/a* and 19 A^y/a mated females were killed by rapid decapitation on *day 18* of pregnancy, 5 *a/a* and 5 A^y/a females on *postpartum day 1*, and 5 *a/a* and 7 A^y/a females on *postpartum day 10*; subsequently, female trunk blood samples were collected. Fetal blood samples of the offspring of seven *a/a* and seven A^y/a females and newborn blood were collected. In total, 10 μl of blood from every fetus or newborn was sampled after rapid decapitation, and the samples from one litter were pooled. Blood samples from the young on *postpartum day 10* were collected individually from the *a/a* genotype males in the six-pup litters.

In the females killed on *day 18* of pregnancy, the weights of the fetoplacental units were calculated as the weights of the uterus with fetuses divided by the numbers of fetuses. To examine maternal influence on pup growth rate during the maternal care period, BW of every pup on *postpartum day 1* (when it was impossible to visually determine the agouti genotype of pups) and only *a/a* pups on *postpartum days 10* and *28* were measured in offspring from eight *a/a* and eight A^y/a mothers. All pups were born in six-pup litters. The data from male and female pups were combined because no sex differences were observed in pup BW.

The other mated females were used to investigate the maternal influences on progeny metabolic phenotypes.

Experimental Procedures in Offspring After Weaning

Offspring metabolism was studied in young of only the *a/a* genotype (normal metabolism). To diminish the impact of litter size and maternal body conditions on offspring metabolic phenotypes, only one male and/or one female from the same mother and only those born in litters of six pups were studied. The young born to 175 dams were used in various experiments. The numbers of male and female young that were used in each experiment are indicated in Table 1. The number of young is equal to the number of mothers. For all experiments, the young born to *a/a* and A^y/a mothers were separated from their mothers when they were 30 days old and were then housed individually until treatment.

To investigate maternal influence on progeny growth rate and FI after weaning, BW and FI were measured in females and males once a week until the age of 10–12 wk and BW gain was calculated for every animal as the absolute change in BW during a week. FI was estimated as the difference between the initial weight of food supplied and the amount of food left on the grid. To investigate the maternal influence on progeny glucose metabolism in maturity, plasma insulin concentrations and glucose tolerance were measured in 10- to 14-wk-old females and males. For the insulin measurement, mice that had been fasted overnight (12 h) were killed by rapid decapitation and samples of trunk blood were collected. Plasma insulin concentrations were measured in mice that were used for FI and BW measurements and in the additional group of male mice (Table 1). For the glucose tolerance test (GTT), mice were fasted for 12 h and injected intraperitoneally with glucose (1 mg/g BW); blood was sampled from the

Table 1. *Number of male and female offspring used in experimental procedures in postweaning period*

Treatments and Measurements	Males		Females	
	A^y/a mother	*a/a* mother	A^y/a mother	*a/a* mother
FI, BW, plasma insulin	7	9	12	12
Plasma insulin	5	3		
GTT, blood glucose	6	6	4	4
24-h food deprivation				
FI after FD	7	9		
Metabolic parameters after FD	5	5		
Control (FI and metabolic parameters)		6		
Leptin sensitivity				
Leptin	7	5		
Saline	7	5		
Leptin sensitivity after 24-h food deprivation				
Leptin	7	5		
Saline	6	5		
HFD				
HFD	7	8		
Control	7	6		
Total	71	72	16	16

FI, food intake; BW, body weight; GTT, glucose tolerance test; FD, food deprivation; HFD, high-fat diet.The number of young is equal to the number of mothers and the number of litters.

tail vein before injection and at 20, 40, and 80 min after glucose injection.

Maternal influence on leptin sensitivity and response to high-fat (HF) diet and 24-h food deprivation was investigated only in male progeny. To investigate maternal influence on response to HF diet, males were divided into weight-matched groups at the age of 9–10 wk and fed either a standard or HF nonpurified chow diet for 10 wk. All food and water were provided ad libitum. BW and FI were measured once a week, and EI was calculated. At the end of the experiment, the mice were killed by rapid decapitation and the weights of the abdominal fat pads were measured.

To investigate maternal influence on FI regulation after food deprivation, FI, hypothalamic expression of neuropeptides and leptin receptor isoform Rb (Ob-Rb), circulating levels of leptin and glucose, and sensitivity to exogenous leptin were measured in males after 24 h of food deprivation. At the age of 12–14 wk, male mice were food deprived for 24 h (starting at 1800). Because no significant differences in daily FI were observed between males born to *a/a* and A^y/a mothers, only males born to *a/a* mothers were used as the control group. In some food-deprived males, FI was measured every hour for 3 h and then 24 h after the beginning of feeding. At the same time, FI was measured in males fed ad libitum (control). The other food-deprived males were decapitated at the end of deprivation at the same time as the control males, and blood and hypothalamus samples were collected.

To investigate maternal influence on sensitivity to leptin under fed conditions, the mice were administered the minimum doses that have been shown to modify BW or FI in C57BL mice (10). The 10- to 12-wk-old males were divided into two groups, which received intraperitoneal injections of recombinant murine leptin (2.0 μg/g BW) or saline for 2 days 1 h before dark (1700). FI was measured daily (from 1800 to 1800), and BW was measured before the first injection and 25 h after the second injection. To measure plasma concentrations of leptin and hypothalamic gene expression of Agouti gene-related protein (AgRP) and proopiomelanocortin (POMC), mice were killed by rapid decapitation 25 h after the second injection. Trunk blood samples were collected, and entire hypothalami were excised and immediately snap-frozen in liquid nitrogen.

To examine maternal influence on sensitivity to leptin after food deprivation, we used the modified protocol published by Swart et al. (45). The authors have shown that leptin administration to 24-h food-deprived C57BL male mice did not affect 2-h FI but significantly reduced FI between 2 and 6 h of refeeding. In our experiment, male mice were food-deprived for 24 h (starting at 1800) at the age of 10–12 wk and injected with recombinant murine leptin (4.0 μg/g BW) or saline 2 h before the beginning of feeding (at 1600). FI was measured 3 h and then 24 h after the beginning of feeding.

Experiments with Leptin Injections into Dams at End of Pregnancy

To examine the influence of elevated maternal leptin levels at the end of pregnancy on progeny phenotype, 10 *a/a* C57BL/6J females were mated with *a/a* C57BL/6J males at 10 wk of age and housed individually from the day a copulatory plug was detected (pregnancy *day 1*). On *day 17* of pregnancy, five females received intraperitoneal injections of recombinant murine leptin (4.0 μg/g BW) dissolved in saline to a final concentration of 500 μg/ml and five females were injected with saline (control). At birth the females and pups were weighed, and the litters that contained more than seven pups were reduced to seven pups. In the control group, four females had seven-pup litters and one female had a six-pup litter. In the leptin-treated group, three females had seven-pup litters and the others had eight- and nine-pup litters. On *postpartum day 28* two males and two females from each litter were separated from their mothers and housed individually, and their BW and FI were measured once a week until the age of 16 wk. During this period, all animals were fed with a standard chow diet ad libitum. From the age of 16 wk, one male and one female from each litter continued to receive a standard diet and one male and one female began to receive palatable food in addition to standard chow. Their BWs and consumption of standard pellet chow were measured once a week over the course of 5 wk. The consumption of palatable food (lard, sweet butter biscuits, and sunflower seeds) was not measured. Five animals were included in every experimental group.

Materials

Murine recombinant leptin was purchased from PeproTech (Princeton, NJ).

Plasma Hormone Assays

Concentrations of leptin and insulin were measured with commercial kits (leptin: R&D Systems, Minneapolis, MN; insulin: RIA-INS-PG-^{125}J, ChemPharmSynthesis, IBOCH of NASB, Minsk, Belarus).

Blood glucose concentrations were determined with a reflectance glucometer by the glucose oxidase method (One Touch Basic Plus, Lifescan). Plasma glucose concentrations were measured with a commercial kit (Fluitest GLU, Analyticon Biotechnologies, Lichtenfels, Germany).

Relative Quantitation Real-Time PCR

Total RNA was isolated from individual hypothalami of males with TRI Reagent (Ambion) according to the manufacturer's instructions. The total RNA was used as a template to generate first-strand cDNA synthesis with Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) and oligo(dT) as a primer. Applied Biosystems TaqMan gene expression assays (ObRb-LepR Mm00440181_m1, POMC Mm00435874_m1, and AgRP Mm00475829_g1) with β-actin as endogenous control [TaqMan endogenous controls with FAM dye label and MGB mouse β-actin (ACTB)] and TaqMan Gene Expression Master Mix were used for relative quantitation real-time PCR. Sequence amplification and fluorescence detection were done with the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Reactions were performed in triplicate and the results averaged. Relative quantitation

was performed by the comparative C_T method, where C_T is threshold cycle.

Neuropeptide Y (NPY) expression was measured by semiquantitative RT-PCR with tgtttgggcattctggctgagg (forward) and ttctgggggcgttttctgtgct (reverse) primers for NPY and gtgggccgccctaggcaccag (forward) and ctctttgatgtcacgcacgatttc (reverse) primers for β-actin. Sequence amplification was performed with a BIS thermocycler (BIS-H, Coltsovo, Russia; **www.bisn.ru**) with an annealing temperature of 62°C and 27 cycles for NPY cDNA amplification and an annealing temperature of 59°C and 19 cycles for β-actin cDNA amplification. PCR products were visualized on 1.5% agarose gels by ethidium bromide staining. Relative gene expression was quantified by densitometry with a Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) and was normalized to the β-actin cDNA signals. Reactions were performed in triplicate, and the results were averaged.

Statistical Analysis

The results are presented as means ± SE from the indicated number of mice. Two-way ANOVA was used to compare BW and FI after weaning [with factors "maternal genotype" (*a/a*, *A^y/a*) or "treatment of mother" (saline, leptin) and "age"], blood glucose concentrations during GTT ("maternal genotype" and "time after glucose injection"), fat pad weights ("maternal genotype" and "diet"), BW changes, glucose and leptin concentrations, neuropeptide expression levels, and FI during 21 h of refeeding after food deprivation ["maternal genotype" and "treatment" (leptin, saline)]. To examine the maternal influence on the response to a leptin administration in the fed conditions, daily FI was analyzed initially by three-way ANOVA with the factors "maternal genotype," "treatment" (leptin, saline), and "day of treatment" (*day 1*, *2*), and then separately by two-way ANOVA in leptin-treated or control groups ("maternal genotype" and "day of treatment") and in the males born to *a/a* or *A^y/a* mothers ("treatment" and "day of treatment"). To examine the maternal influence on the response to a diet, BW, FI, and EI/BW were analyzed initially by three-way ANOVA with the factors "maternal genotype" or "maternal treatment," "diet," and "age" and then separately by two-way ANOVA in control and HF or palatable diet animals with the factors "maternal genotype" or "maternal treatment" and "age." In addition, multiple comparisons were performed with the post hoc Duncan test. The comparisons between single parameters were performed with a two-tailed Student's *t*-test. Significance was determined as $P < 0.05$. The STATISTICA 6 software package (StatSoft) was used for analysis.

RESULTS

BWs and Plasma Leptin Levels in Female Mice and Their Progeny

BWs (without fetuses) in *A^y/a* females were slightly but significantly higher than in *a/a* females at the end of pregnancy and on *postpartum day 1*. On *postpartum days 10* and *28*, BWs of *a/a* and *A^y/a* mothers were similar (Table 2). Leptin levels were approximately twofold higher in *A^y/a* than in *a/a* females at the end of pregnancy. After parturition, leptin levels decreased and remained higher in *A^y/a* females compared with *a/a* females on *postpartum day 1* (Table 2). However, the leptin levels in *a/a* and *A^y/a* mothers were comparable at the peak of lactation on *postpartum day 10*.

Maternal genotype did not influence the weights of the fetoplacental units on *day 18* of the pregnancy or the pup BWs during the maternal care period. Leptin levels in the progeny were also not influenced by maternal genotype (Table 2). No significant correlations were observed between plasma leptin concentrations in the mothers and their progeny. Leptin levels were approximately threefold lower in newborns than in fetuses [0.10 ± 0.03 (n = 10), 0.38 ± 0.04 (n = 14); $P < 0.0001$, Student's *t*-test, newborns and fetuses, respectively].

Influence of Inherited Maternal Hyperleptinemia During Pregnancy on Offspring Metabolic Phenotypes

Impact of maternal leptin levels during pregnancy on FI, BW, and glucose metabolism of male and female offspring in postweaning period. Abnormally high leptin levels during pregnancy did not influence any of the characteristics studied in female progeny. Female mice born to *a/a* and *A^y/a* mothers displayed the same BW (Fig. 1*A*) and FI (Fig. 1*C*) between 5 and 10 wk of age, the same BW gain after weaning (Table 3), the same fasting blood glucose levels and glucose tolerance (Fig. 1*E*), and the same fasting plasma insulin levels (Table 3).

Contrasting results were observed in the male progeny. Males born to *a/a* and *A^y/a* mothers displayed the same FI (Fig. 1*D*) but different growth rates during the postweaning period. At the time of separation from their mothers, the BWs of the male progeny of *a/a* and *A^y/a* mice were equal. Compared with males born to *a/a* mothers, males born to *A^y/a* mothers had lower BW gains between 5 and 7 wk of age (Table 3) and lower BWs beginning at 6 wk of age (Fig. 1*B*). No differences in fasting blood glucose levels or glucose tolerance (Fig. 1*F*) were observed between males born to *a/a* and *A^y/a* mothers, but fasting plasma insulin levels were significantly higher in those born to *A^y/a* mothers (Table 3). Thus prenatal exposure to high maternal leptin levels had a sex-specific effect on progeny, affecting growth rate after weaning and some aspects of glucose metabolism in male offspring.

Table 2. *BW and plasma leptin concentration in female mice and their progeny on pregnancy day 18 and on postpartum days 1, 10, and 28*

	a/a Mothers				*A^y/a* Mothers			
	Pregnancy *day 18*	Pp *day 1*	Pp *day 10*	Pp *day 28*	Pregnancy *day 18*	Pp *day 1*	Pp *day 10*	Pp *day 28*
BW								
Mother	26.2 ± 0.5 (19)	23.6 ± 0.6 (8)	29.9 ± 0.5 (18)	27.1 ± 0.9 (6)	27.6 ± 0.4 (19)*	26.9 ± 0.5 (8)***	29.4 ± 0.5 (13)	28.3 ± 0.5 (7)
Progeny	1.34 ± 0.03 (19)	1.40 ± 0.02 (48)	5.6 ± 0.1 (56)	10.3 ± 0.4 (19)	1.37 ± 0.03 (19)	1.43 ± 0.02 (48)	5.6 ± 0.1 (42)	10.7 ± 0.5 (15)
Leptin								
Mother	22.1 ± 3.3 (19)	3.8 ± 1.5 (5)	1.1 ± 0.4 (5)		48.7 ± 7,2 (19)**	12.6 ± 3.1 (5)*	1.8 ± 0.6 (7)	
Progeny	0.33 ± 0.06 (7)	0.11 ± 0.05 (5)	3.9 ± 1.2 (5)		0.43 ± 0.05 (7)	0.10 ± 0.05 (5)	3.1 ± 1.4 (7)	

Data (in g for BW and in ng/ml for plasma leptin concentration) are presented as means ± SE for the number of mice indicated in parentheses. The weight of progeny on pregnancy *day 18* was calculated as the weight of the uterus with fetuses divided by the number of fetuses. BW of females on *day 18* of pregnancy was calculated as the difference between female intravital body weight and weight of the uterus with fetuses. Pp, postpartum. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, Student's *t*-test, *A^y/a* vs. *a/a*.

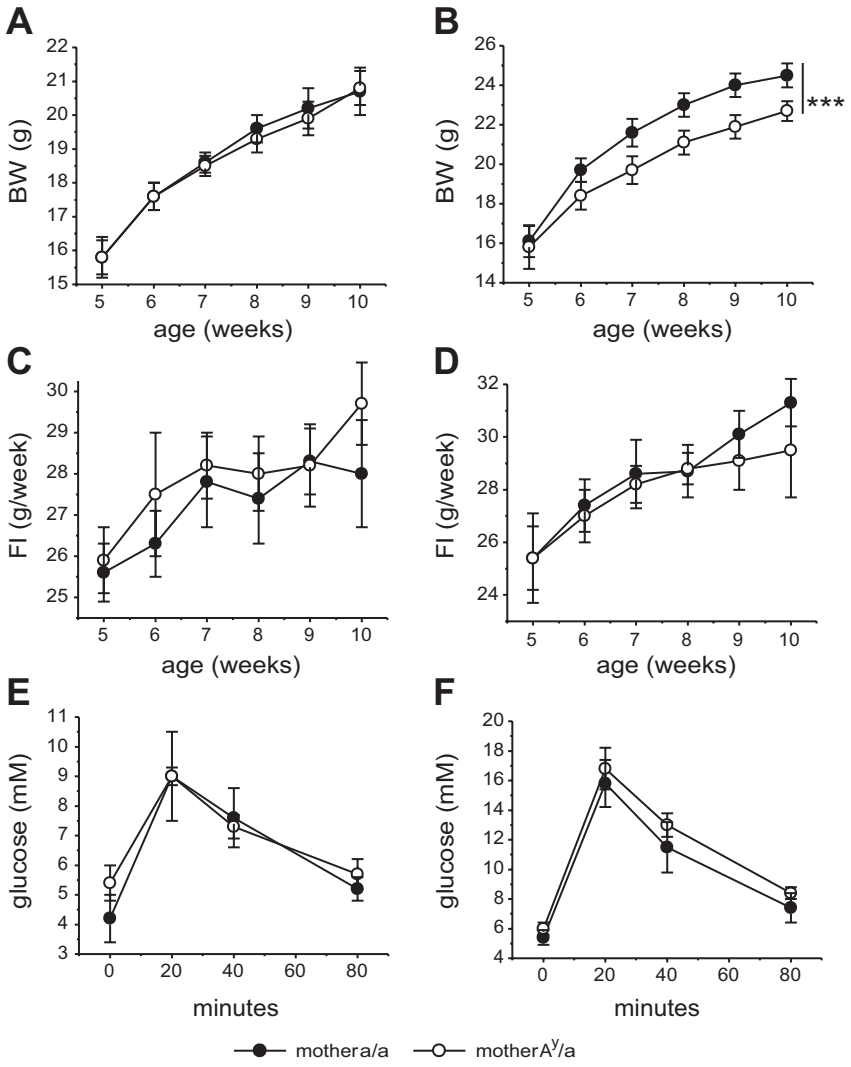


Fig. 1. Female (*A*) and male (*B*) body weight (BW), female (*C*) and male (*D*) food intake (FI), and female (*E*) and male (*F*) blood glucose concentrations during the glucose tolerance test (GTT) in mice born to *a/a* and A^y/a mothers. ***$P < 0.0001$, genotype of mother, 2-way ANOVA with factors "genotype of mother" and "age." Data are means ± SE from 7–12 animals in every group for the FI and BW calculations and 5 or 6 animals for the GTT calculations.

Because the maternal effect on progeny development was observed only in males, only male offspring were studied in the subsequent experiments.

Impact of maternal leptin levels during pregnancy on response to HF diet in male offspring. To investigate whether enhanced maternal leptin predisposes offspring to developing DIO, adult BW-matched males born to A^y/a and control mothers were fed control (C) and HF diets. However, the HF diet did not induce pronounced obesity in males. Males that were fed either the C or HF diet showed similar BW during all periods of diet treatment that was independent of maternal genotype (3-way ANOVA with the grouping factors "age", "diet," and "maternal genotype"; Fig. 2*A*). FI and the FI-to-BW ratio were significantly lower in HF than in C males ($P < 0.001$, 3-way ANOVA). However, EI and EI/BW were the same in the C and HF diet groups in mice born to control mothers (Fig. 2, *B* and *C*). The genotype of the mothers influenced EI and EI/BW differently in mice fed C or HF diet. Compared with males born to *a/a* mothers, those born to A^y/a displayed higher EI and EI/BW in the C group ($P < 0.001$ for both cases, 2-way ANOVA, factors "maternal genotype" and "age") and similar EI and EI/BW in the HF group (Fig. 2, *B* and *C*). In contrast to mice born to *a/a* mothers, those born to A^y/a mothers decreased their EI and EI/BW on the HF diet compared with the C diet (Fig. 2, *B* and *C*).

Table 3. *BW gain after weaning and adult plasma insulin concentrations in male and female offspring of a/a and A^y/a female mice*

Young	Mother	Body Weight Gain, g		Insulin, pM
		6th week of life	7th week of life	
Females	*a/a*	1.9 ± 0.3 (12)	1.2 ± 0.2 (12)	41.8 ± 6.9 (10)
	Ay/a	2.0 ± 0.3 (11)	1.1 ± 0.3 (11)	36.7 ± 8.6 (10)
Males	*a/a*	3.4 ± 0.5 (7)	1.9 ± 0.1 (8)	19.7 ± 7.6(12)
	Ay/a	2.6 ± 0.2 (5)	1.3 ± 0.1(7)**	48.0 ± 9.2 (12)*

Data are presented as means ± SE for the number of mice indicated in parentheses. Males and females were separated from mothers at the age of 30 days and housed individually. Plasma insulin concentrations were measured in 10- to 12-wk-old males and females that were fasted overnight. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, Student's *t*-test, males born to A^y/a vs. *a/a* mothers.

Although a HF diet did not increase BW in male mice, the HF diet increased abdominal fad pad weights by approximately twofold (Fig. 2*D*; $P < 0.05$ for diet, 2-way ANOVA with the factors "maternal genotype" and "diet") independent of the genotype of

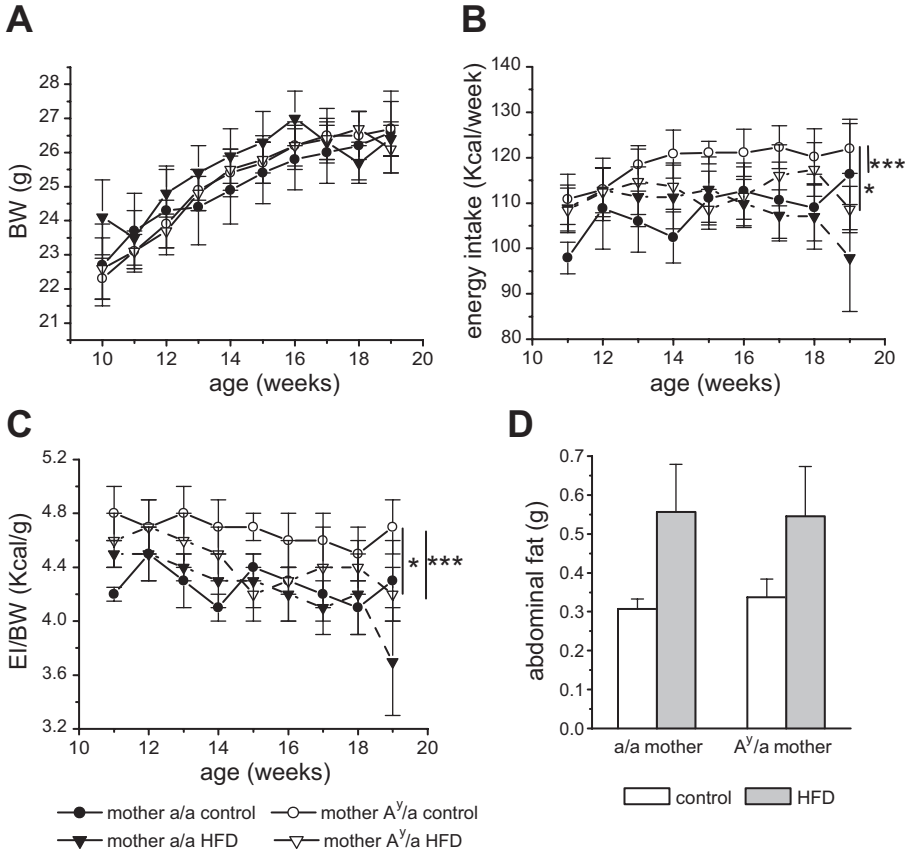


Fig. 2. Influence of high-fat diet (HFD) on BW (*A*), energy intake (EI; *B*), ratio of EI to BW (*C*), and weight of abdominal fat pads (*D*) in male mice born to *a/a* and *A^y/a* mothers. $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, genotype of mother, 2-way ANOVA with factors "genotype of mother" and "age." Genotypes of the mothers are indicated at *bottom*. Data are means ± SE from 6–8 animals in every group.

the mother. Thus prenatal exposure to high maternal leptin levels did not promote obesity development in adult male mice fed the HF diet and affected FI regulation only in males that were fed the standard diet and not in those fed the HF diet.

Impact of maternal leptin levels during pregnancy on FI, circulating levels of leptin and glucose, hypothalamic neuropeptide expression, and sensitivity to leptin in food-deprived male mice. To investigate whether prenatal exposure to high maternal leptin levels influences FI and BW regulation under fasting conditions, adult male offspring of *A^y/a* and control mothers were deprived of food for 24 h. Food-deprived males born to both *a/a* and *A^y/a* mothers consumed more food than males fed ad libitum during the first 3 h of refeeding (Fig. 3*A*). FI in food-deprived males did not differ from that in males fed ad libitum during the subsequent 21 h. The cumulative 24-h FI after food deprivation in male progeny from *A^y/a* mothers did not increase, unlike that in progeny from *a/a* mothers (Fig. 3*A*). Male progeny from *A^y/a* mothers also displayed significantly lower BW gains during the 24 h of refeeding than males from *a/a* mothers (Fig. 3*B*).

Neither the genotype of the mother nor food restriction influenced circulating levels of glucose (Fig. 3*C*) or leptin (Fig. 3*D*) or expression of POMC in the hypothalamus (Fig. 3*E*). Food deprivation increased the hypothalamic expression of AgRP (Fig. 3*F*) and NPY (Fig. 3*G*) more than twofold, but maternal genotype did not influence this change in expression.

Leptin administration did not affect FI in food-deprived males from either *a/a* or *A^y/a* mothers (Fig. 4*A*). However, leptin administration significantly reduced BW gain during 24 h of refeeding in males from *a/a* mothers but had no effect on BW gain in males from *A^y/a* mothers (Fig. 4*B*). Independent of leptin treatment, males from *A^y/a* mothers displayed the same FI during the first 3 h of refeeding and significantly reduced FI during the subsequent 21 h (Fig. 4*A*) compared with males from *a/a* mothers.

Thus prenatal exposure to high maternal leptin levels was associated with FI inhibition and insensitivity to exogenous leptin in food-deprived male mice.

Impact of maternal leptin levels during pregnancy on sensitivity to exogenous leptin in male offspring. To investigate whether prenatal exposure to high maternal leptin levels influences leptin signaling under normal fed conditions, leptin was administered to fed adult male offspring of *A^y/a* and control mothers. Leptin administration affected FI in males ($P < 0.01$, 3-way ANOVA with the factors "maternal genotype," "treatment," and "day of treatment"); however, significant reduction of FI after leptin treatment was observed only in males born to *a/a* mothers (Fig. 5; $P < 0.01$, 2-way ANOVA with the factors "treatment" and "day of treatment") and was not observed in those born to *A^y/a* mothers. Leptin administration differentiated the males born to *A^y/a* and *a/a* mothers in relation to FI: a significant influence of maternal genotype on FI was detected in the leptin-treated group (Fig. 5; $P < 0.05$, 2-way ANOVA with the factors "maternal genotype" and "day of treatment") and was not detected in the control group. However, leptin administration decreased BW in males born to both *a/a* and *A^y/a* mothers (Fig. 6*A*; $P < 0.0001$, 2-way ANOVA). Neither leptin treatment nor maternal genotype significantly affected hypothalamic expression of AgRP, POMC, or Ob-Rb in male progeny of *a/a* or *A^y/a* mice (Fig. 6, *C–E*).

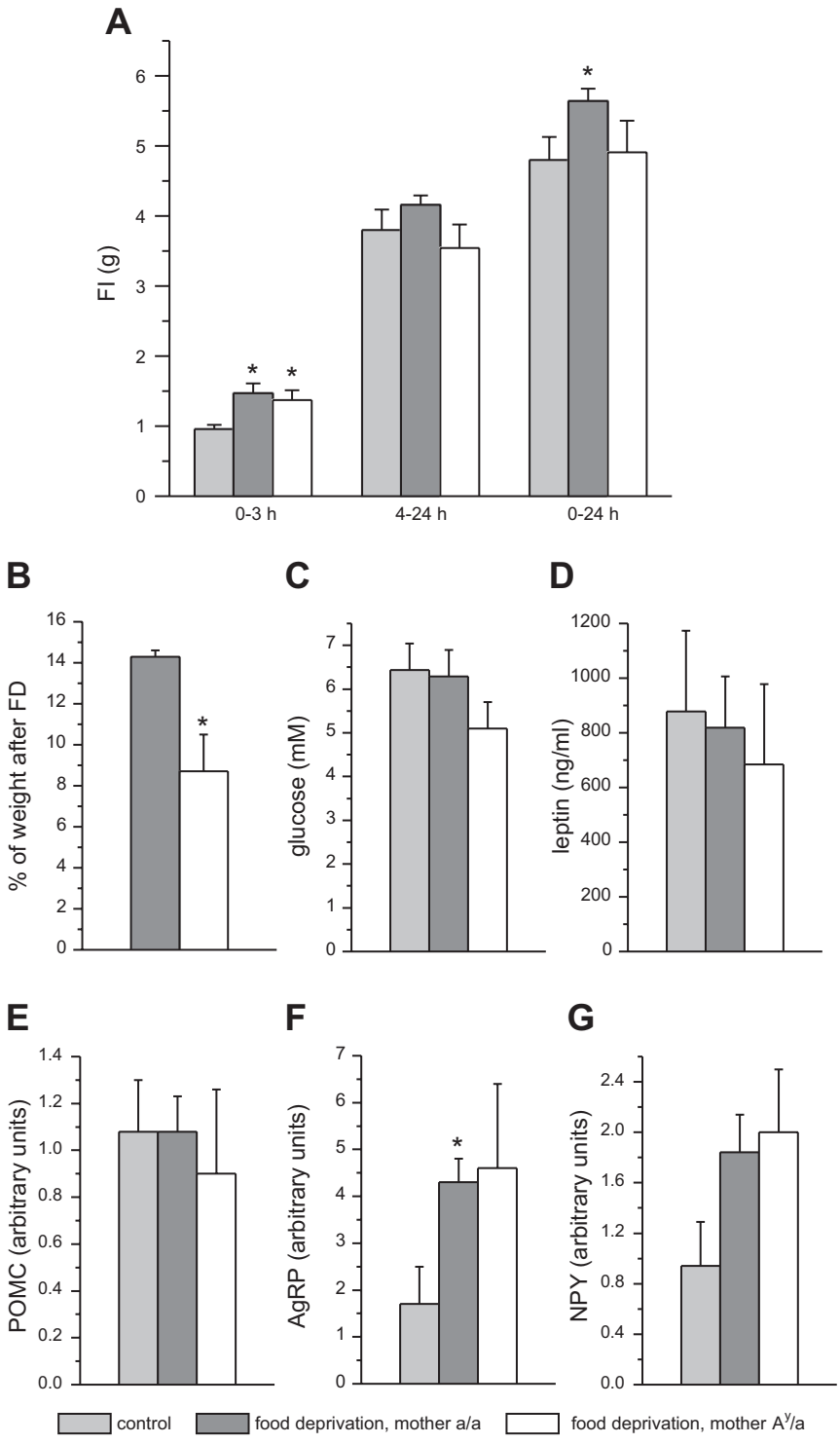


Fig. 3. FI (*A*) and BW gain (*B*) during 24 h of refeeding, plasma glucose (*C*) and leptin (*D*) concentrations, and hypothalamic relative expression of proopiomelanocortin (POMC; *E*), Agouti gene-related protein (AgRP; *F*), and neuropeptide Y (NPY; *G*) genes after 24 h of food deprivation (FD) in male mice born to *a/a* and A^y/a mothers. *$P < 0.05$, Student's *t*-test, food deprivation vs. control (*A* and *F*), males born to A^y/a vs. males born to *a/a* mothers (*B*). The 12- to 14-wk-old males were deprived of food for 24 h. FI was measured 3 h and then 24 h after the beginning of the feeding. BW gain was calculated as the ratio of BW changes during 24 h of refeeding to BW at the end of food deprivation and expressed as %. Gene expression and plasma glucose and leptin concentrations were determined at the end of the deprivation period. Data are means ± SE from 6 (*A*, *C*, and *D*) or 5 (*E–G*) control males, 9 (*A* and *B*) or 5 (*C–G*) food-deprived males born to *a/a* mothers, and 7 (*A* and *B*), 5 (*C* and *D*), or 4 (*E–G*) food-deprived males born to A^y/a mothers.

Plasma leptin levels at 25 h after the second injection were higher in males that received leptin than in control males ($P < 0.01$, 2-way ANOVA), but significant differences between control and leptin-treated groups were observed only in males born to *a/a* mothers (Fig. 6*B*; $P < 0.01$, post hoc Duncan's test). Leptin-treated males born to A^y/a mothers displayed ~30% lower plasma leptin levels ($P = 0.08$, Duncan's test) than those born to *a/a* mothers.

Our data suggest that prenatal exposure to high maternal leptin levels decreases sensitivity to exogenous leptin in male mice.

Influence of Leptin Administration to Dams at End of Pregnancy on Offspring Metabolic Phenotypes

Influence of leptin administration to pregnant dams on offspring FI and BW during postweaning period. The administration of leptin to dams at the end of pregnancy did not

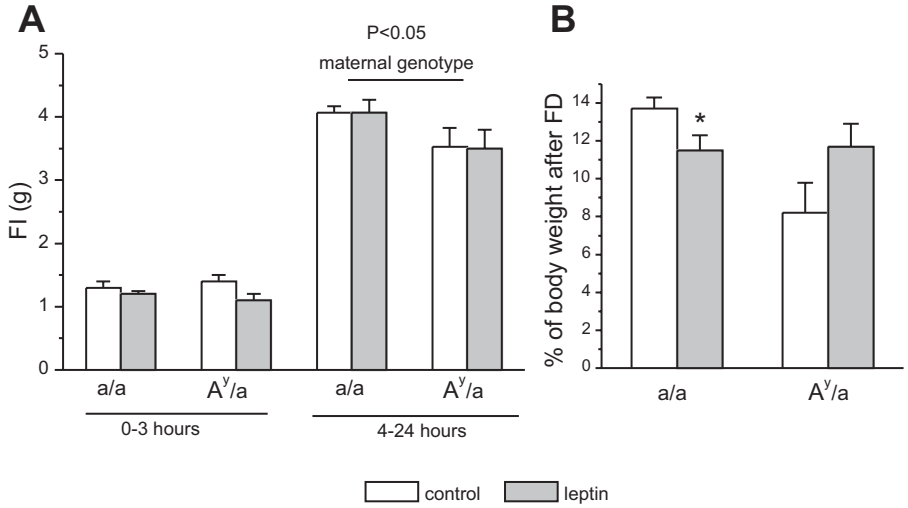


Fig. 4. Leptin influence on FI (*A*) and BW gain (*B*) during 24 h of refeeding after 24 h of food deprivation in male mice born to *a/a* and *A^y/a* mothers. $*P < 0.05$, Student's *t*-test, leptin vs. control for males born to *a/a* mothers. Genotypes of the mothers are indicated below columns. The 10- to 12-wk-old males were food deprived for 24 h and injected with recombinant murine leptin (4 μg/g BW, leptin-treated group) or with saline (control) 2 h before the beginning of feeding. FI was measured 3 h and then 24 h after the beginning of feeding. Every group contained 5–7 animals. BW gain was calculated as the ratio of BW changes during 24 h of refeeding to the BW at the end of the food deprivation period and expressed as %. For FI, data were analyzed by 2-way ANOVA with factors "genotype of mother" and "treatment" separately for the first 3 h and the subsequent 21 h after the beginning of feeding period. Data are presented as means ± SE from 5–7 animals in every group.

influence pup BWs at birth [1.47 ± 0.02 g ($n = 34$) and 1.42 ± 0.02 g ($n = 38$), saline and leptin, respectively] or on *postpartum day 28* [11.9 ± 0.2 g ($n = 34$) and 11.5 ± 0.2 g ($n = 35$), saline and leptin, respectively]. However, the BWs of both male and female offspring from mothers that received leptin were lower compared with the offspring from control mothers between 5 and 11 wk of age (2-way ANOVA, factors "maternal treatment" and "age," $P < 0.05$ for female offspring, $P < 0.001$ for male offspring; Fig. 7, *A* and *B*). Administration of leptin to mothers did not influence FI in female offspring (Fig. 7*C*) and significantly decreased FI in male offspring between 5 and 15 wk of age (2-way ANOVA, factors "maternal treatment" and "age," $P < 0.001$; Fig. 7*D*).

Influence of leptin administration to pregnant dams on offspring response to palatable food in adulthood. The HF diet did not induce obesity in the male mice; therefore, we added palatable fat and sweet food (natural lard as a source of saturated fatty acids, sunflower seeds as a source of unsaturated fatty acids, and sweet butter biscuits) to standard chow to enable the animals to freely choose the type of food. The switch to a palatable diet decreased the animal consumption of standard chow by approximately fourfold, and leptin administration to dams did not affect the amount of chow consumed. Palatable food feeding induced the development of obesity in both male and female offspring of the control mothers (Fig. 8, *A* and *C*), with a higher rate of BW gain in males than in females. During the first 2 wk of palatable food feeding, the BW of males increased by 12.0 ± 2.8% ($n = 5$) of the initial weight and became significantly higher than the BW of males fed standard chow (Fig. 8*A*); however, female BW increased only 4.1 ± 1.4% ($n = 5$, $P < 0.05$, Student's *t*-test, between males and females). Leptin administration to dams at the end of pregnancy affected the response to palatable food in male and female offspring differently. No interaction was observed between "maternal treatment" and "diet" in female offspring: females born to both leptin-treated and control mothers developed obesity on the palatable diet with the same rate of BW gain (Fig. 8, *C* and *D*). In contrast, a significant interaction was detected between "maternal treatment" and "diet" in male offspring (3-way ANOVA, $P < 0.01$), indicating a different response to palatable food feeding in males born to control and leptin-treated mothers. Leptin administration at the end of pregnancy inhibited obesity development induced by the palatable diet in male offspring (Fig. 8*B*). Specifically, on the palatable diet BWs of males born to leptin-treated mothers were lower than BWs of males born to control mothers ($P < 0.05$, 2-way ANOVA, factors "maternal treatment" and "age") and were the same as the BWs of control diet males that were born to leptin-treated mothers.

Thus prenatal exposure to high maternal leptin levels at the end of pregnancy decreased BW after weaning in both males and females, decreased FI on the standard diet, and inhibited obesity induced by the palatable diet only in males.

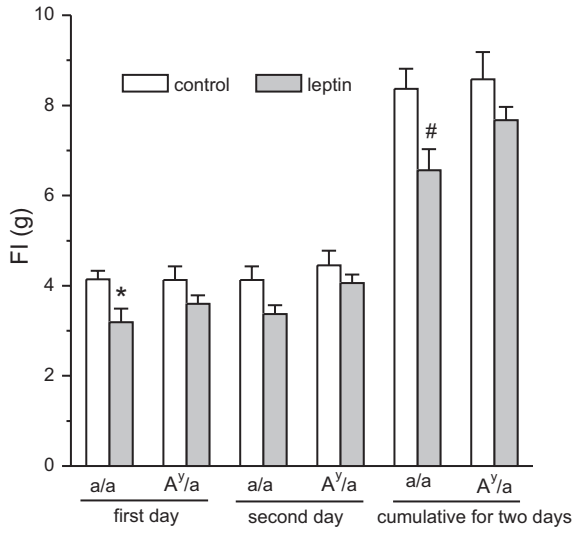


Fig. 5. Leptin influence on FI in male mice born to *a/a* and *A^y/a* mothers. $*P < 0.05$, Duncan's test, males born to *a/a* mothers, leptin-treated vs. control. $\#P < 0.05$, Student's *t*-test, males born to *a/a* mothers, leptin-treated vs. control. Genotypes of mothers are indicated below columns. The 10- to 12-wk-old males received intraperitoneal injections of recombinant murine leptin (2 μg/g BW, leptin-treated group) or saline (control) for 2 days 1 h before dark. FI was measured daily. Data are presented as means ± SE from 5–7 animals in every group.

DISCUSSION

In this study, we examined the influence of chronically (genetic model) and transitory (leptin injection) elevated leptin levels during pregnancy on metabolic characteristics and sus-

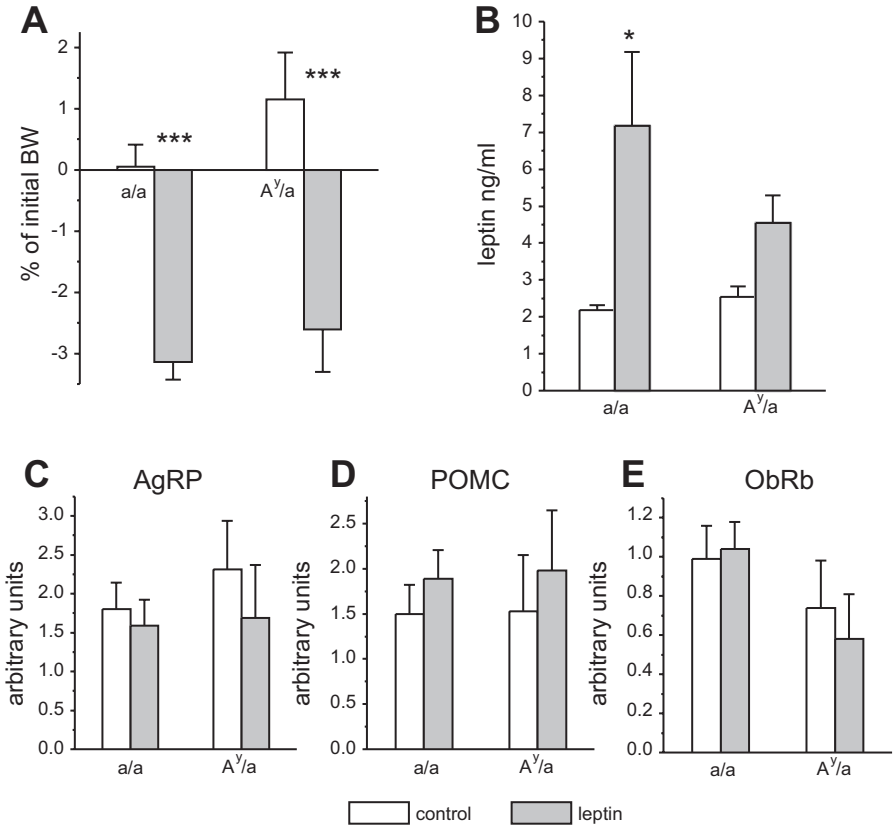


Fig. 6. Leptin influence on BW (*A*), plasma leptin concentrations (*B*), and hypothalamic relative expression of AgRP (*C*), POMC (*D*), and leptin receptor isoform Rb (Ob-Rb; *E*) genes in male mice born to *a/a* or A^y/a mothers. ***$P < 0.0001$, Duncan's test, leptin treated vs. control. *$P < 0.01$, Duncan's test, males born to *a/a* mothers, leptin treated vs. control. Genotypes of mothers are indicated below columns. The 10- to 12-wk-old males received intraperitoneal injections of recombinant murine leptin (2 μg/g BW, leptin-treated group) or saline (control) for 2 days 1 h before dark. BW was measured before the first injection and 25 h after the second injection, and the ratios of BW changes to the initial BW were calculated and expressed as %. Plasma concentrations of leptin and hypothalamic gene expression of AgRP, POMC, and Ob-Rb were measured 25 h after the second injection. Data are presented as means ± SE from 5 leptin-treated and 5 control males born to *a/a* mothers and 7 leptin-treated and 7 control (*A* and *B*) or 5 leptin-treated and 5 control (*C–E*) males born to A^y/a mothers.

ceptibility to DIO in progeny mice. The advantages of using a genetic model (C57BL/6J-A^y female mice) include the ability to imitate hyperleptinemia (which is observed in obesity) and to separate the influence of elevated leptin levels from the influence of other abnormalities that accompany obesity. Furthermore, this model restricts the programming influence of maternal leptin to the prenatal stage of development.

According to our previous results (27), leptin levels in pregnant A^y mice were twofold higher than in *a/a* mice; however, BW was only slightly higher at the end of pregnancy. We minimized the impact of the other factors that influence the progeny phenotype, such as genetic background (26), maternal diet (7, 17), litter size, and individual maternal body conditions (38) because the dams belonged to the same line and were fed the same standard diet and because only one male and/or one female from the same mother and only from litters of six pups were studied. In addition, the use of this model allowed us to avoid the impact of stress associated with experimental manipulations (surgery, injections) on progeny development. Therefore, we assume that the influence of the A^y mutation in mothers on progeny phenotypes is related to fetal exposure to high levels of maternal leptin. To confirm this assumption and to reveal the significance of the late stage of prenatal development on the programming effect of maternal leptin, we administered leptin to pregnant *a/a* dams at the end of pregnancy.

The leptin injection at the end of pregnancy did not recapitulate the effects of the A^y mutation completely; however, both enhanced leptin levels during the entire pregnancy period (A^y mice) and leptin injections at the end of pregnancy had a marked effect on metabolic phenotype in the offspring. These data directly confirm the suggestion that maternal leptin is a factor involved in developmental programming (48).

Both the A^y mutation in mothers and the leptin injection in pregnant dams more strongly affected male than female offspring; therefore, the changes in maternal leptin levels during pregnancy may contribute to sex-specific programming effects of maternal diet (40), maternal obesity (33), or maternal undernutrition (34). However, the underlying mechanisms remain to be elucidated.

In the male progeny of both A^y and leptin-treated mothers, prenatal exposure to high maternal leptin levels did not predispose to the development of obesity on the standard diet, did not increase the risk of obesity on the HF diet in the offspring of A^y mothers, and protected the offspring of leptin-treated mothers on the palatable sweet and fat diet from the development of obesity. A protective effect of leptin administration to the dams at the end of pregnancy suggests that the late period of fetal development is sensitive to the programming action of leptin and the leptin effects in late pregnancy are crucial to program susceptibility to DIO.

Whether chronic hyperleptinemia in A^y mothers protects offspring from DIO remains unknown, because the HF diet used in our experiment did not induce evident obesity development during 10 wk of treatment, most likely because of diet composition. In C57BL mice, the development of obesity strongly depends on dietary fat types, and only a highly saturated fat diet is obesogenic (50). In the progeny of leptin-treated mothers, we used a palatable diet with high saturated fat (lard) and high carbohydrate contents, which is more effective to induce obesity. Therefore, further investigations with the

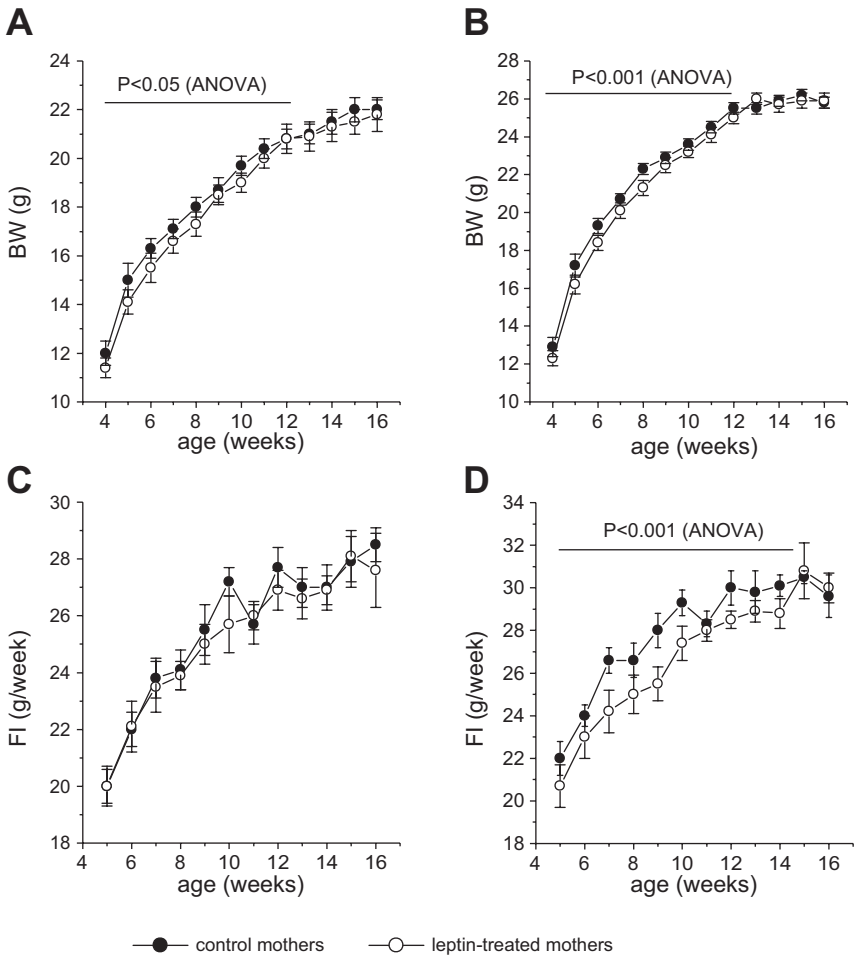


Fig. 7. Influence of leptin administration to *a/a* mice at the end of pregnancy on female (*A*) and male (*B*) offspring BW and female (*C*) and male (*D*) offspring FI during the postweaning period. Pregnant *a/a* C57BL/6J mice were injected with recombinant murine leptin (4 μg/g BW) or saline on *day 17* of pregnancy. Data were analyzed by 2-way ANOVA with factors "treatment of mother" (leptin, saline) and "age" between 5 and 11 wk of age for BW and between 5 and 15 wk of age for FI. Data are presented as means ± SE from 10 animals in every group.

palatable diet are needed to determine whether prenatal exposure to chronic hyperleptinemia will protect the male progeny of A^y mothers from DIO.

Overall, our data are in accordance with results obtained in rats that have indicated that prenatal exposure to high maternal leptin levels protects male offspring from DIO (43, 44). However, a large body of evidence suggests that maternal obesity predisposes offspring to development of obesity when dietary fat and caloric density are increased (29, 39, 42, 51). Together with the data mentioned above (43, 44), our results contradict the idea that obesity in the offspring of obese mothers may be a consequence of elevated leptin levels in the blood of the mother. Maternal hyperglycemia and hyperlipidemia during pregnancy may represent the primary factors that contribute to inappropriate fetal programming in obese mothers (15), and the programming effect of hyperleptinemia possibly attenuates the negative effects of these factors for their progeny.

The phenotypic deviations observed in males that were prenatally exposed to maternal hyperleptinemia (enhanced ratio of EI to BW in the offspring of A^y mothers and resistance to DIO in the offspring of leptin-treated mothers) are in agreement with the paradigm of predictive adaptive response (14). High maternal leptin levels may be interpreted by the fetuses as a high nutritional state and result in developmental trajectories that produce phenotypes better suited for food abundance and, possibly, less suited for food deficiency. Our results confirm the last suggestion: Maternal hyperleptinemia reduced resistance to fasting in offspring. Males born to A^y mothers displayed less weight gain than males born to control mothers and did not increase their cumulative FI during 24 h of refeeding after food deprivation; however, males born to control mothers demonstrated hyperphagia. Fasting-induced hyperphagia is believed to be related to the induction of the expression of the orexigenic neuropeptides NPY and AgRP in the hypothalamus. This induction occurs quickly upon fasting and has been associated with changes in leptin and glucose levels (35). The regulation of FI at the beginning of eating was not affected by the maternal genotype: The circulating levels of glucose and leptin and the expression of AgRP and NPY were similar at the end of food deprivation, and during the first 3 h of eating the FI was also similar in males born to A^y and control mothers. FI differences between males born to A^y and control mothers were observed later when fasted animals had assuaged their hunger and ate similarly to the control animals (Fig. 4). This effect is potentially due to programming the formation of the satiety stimuli that are related to food digestion and gastric and intestinal distension.

The observed changes in regulation of energy homeostasis in the males prenatally exposed to high maternal leptin levels can be related, at least partially, to maternal influences on leptin signaling, namely, on hypothalamic sensitivity to leptin and on the regulation of leptin levels in blood. Undoubtedly, the other

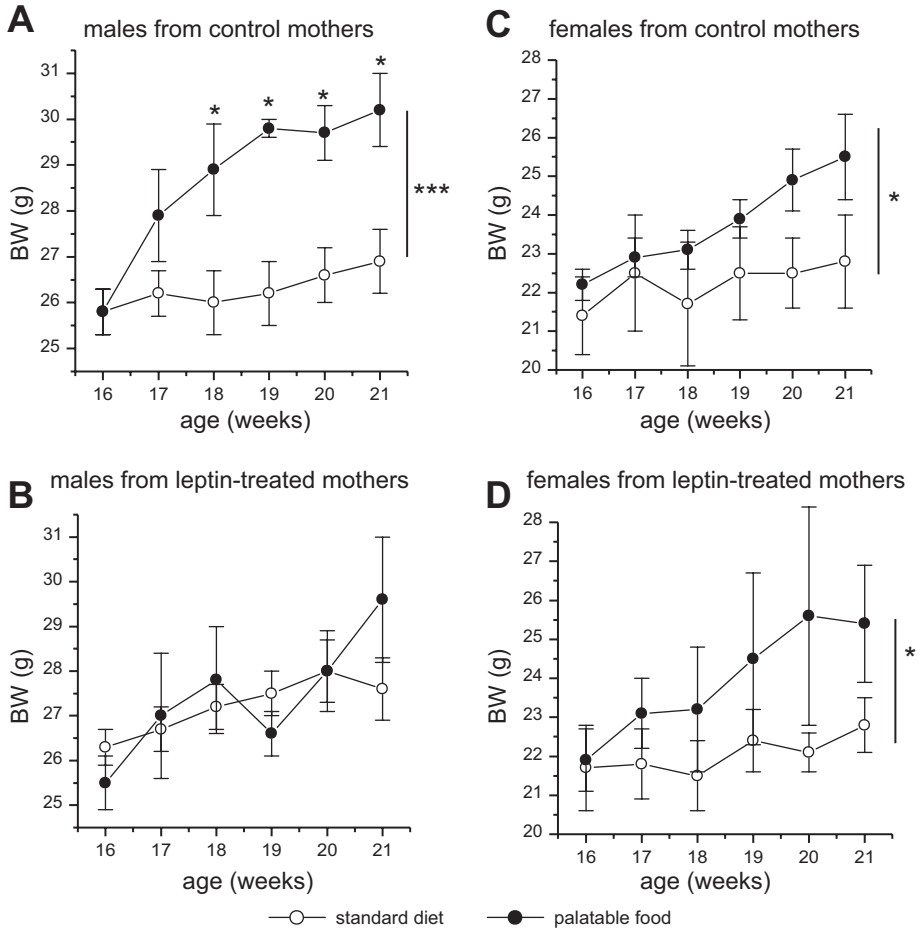


Fig. 8. Influence of the palatable food diet on BW changes in adult male (*A*) and female (*C*) offspring of control mice and male (*B*) and female (*D*) offspring of leptin-treated C57BL mice. *A*: $*P < 0.05$, Duncan's test, palatable vs. control diet; $***P < 0.0001$, diet, 2-way ANOVA with factors "diet" and "age." *C* and *D*: $*P < 0.05$, diet, 2-way ANOVA with factors "diet" and "age." Pregnant *a/a* C57BL/6J mice were injected with recombinant murine leptin (4 μg/g BW, leptin-treated group) or saline (control) on *day 17* of pregnancy. Male and female offspring were fed with palatable food from the age of 16 wk. Palatable food included sweet butter biscuits, lard, and sunflower seeds. The animals received palatable food in addition to standard chow. Data are presented as means ± SE from 5 animals in every group.

aspects of energy balance regulation that were not studied in this work may be affected by maternal leptin levels, such as animal physical activity and/or the efficiency of food utilization. Leptin is known as a key regulator of energy balance (22), and it decreases EI and increases energy expenditure, inducing thermogenesis in brown adipose tissue via various pathways that may also regulate FI, while other pathways signal independently of appetite regulation (11). We discovered the influence of elevated maternal leptin on the sensitivity to leptin in male offspring; however, this effect was altered depending on the feeding conditions. When fed ad libitum, male offspring of A^y mothers had decreased sensitivity to leptin administration in relation to food consumption; however, the leptin influence on BW was unchanged. These results support data from experiments using rats reported by other authors. Leptin administration does not affect FI but reduces BW in rats treated with a HF diet and in the progeny of rats that were undernourished during pregnancy (24). The increased ratio of EI to BW in males from A^y mothers may be related to an inhibition of the anorectic effects of leptin combined with its unchanged thermogenic effects.

The maternal downregulation of leptin signaling in fed male progeny was not realized via the inhibition of hypothalamic leptin receptor expression, and we did not observe modulation of leptin-related neural peptide expression in the hypothalamus; the expression of AgRP, POMC, and Ob-Rb was similar in males born to control and A^y mothers in both the control and leptin-treated groups. However, we did not measure hypothalamic STAT3 expression and phosphorylation after leptin administration, which is a precise method for detecting changes in hypothalamic sensitivity to leptin (9). Therefore, additional experiments need to be performed to reveal whether programming effects of enhanced maternal leptin at the prenatal stage occur via the modulation of leptin action in the hypothalamus or in other targets of the offspring.

In contrast to the fed state, leptin administration did not affect FI but influenced BW gain upon refeeding after food deprivation in the offspring of A^y/a and control mothers: Males born to control mothers significantly reduced their BW gain, whereas males born to A^y mothers did not change their BW gain after leptin administration. Leptin plays an important role in regulating energy expenditure (11); therefore, leptin resistance may reduce the ability to adjust energy expenditure to feeding conditions.

We also found that the rate of recovery of normal blood leptin levels after the intraperitoneal injection of leptin in the fed state was faster in males born to A^y mothers compared with males born to control mothers. This finding suggests that not only leptin signaling but also regulation of leptin circulation in the blood may be affected by maternal leptin.

The mechanisms involved in the programming actions of maternal leptin remain to be elucidated. In mice, leptin has been shown to influence brain development during both the prenatal and early postnatal stages of ontogenesis (3, 47). The

modulation of leptin levels in fetuses and newborns may affect the development of neural pathways related to energy homeostasis regulation, and it has been shown in rats that maternal nutrition during pregnancy influences leptin circulation in pups (6, 31). However, we did not observe any correlation between maternal and progeny leptin levels. Irrespective of the levels of leptin in maternal blood, leptin levels in the progeny of A^y and control mothers were similar during both prenatal and postnatal stages, which suggests that maternal blood leptin may influence fetal development by affecting placenta functions. Leptin has been shown to influence placental development and global placental gene expression profiles (41), placental angiogenesis (19), and placental nutrient transport (20, 49).

Perspectives and Significance

Our data support the hypothesis that maternal leptin is a factor involved in developmental programming. We have shown that hyperleptinemia during pregnancy has sex-specific long-term effects on the regulation of energy balance in progeny, consistent with the hypothesis of "predictive adaptive response." Hyperleptinemia can program the male offspring to develop phenotypes that include an increased ratio of EI to BW, decreased sensitivity to leptin, and decreased resistance to food deprivation; however, hyperleptinemia does not contribute to an enhanced risk of developing obesity. More importantly, we have found that leptin administration at the end of pregnancy protects male offspring from DIO. These data demonstrate that leptin effects in late pregnancy are crucial to programming susceptibility to DIO. Therefore, the period of late fetal development may be an ontogenetic window for therapeutic interventions. A dissection of the pathways by which maternal leptin modifies offspring development is necessary to understand the mechanisms underlying developmental programming and to suggest new strategies for prenatal correction of metabolic diseases.

GRANTS

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) (Grant 09-04-00447-a) and Scientific School 1647.2008.4.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: E.N.M. and N.M.B. conception and design of research; E.N.M., E.V.C., and P.E.P. performed experiments; E.N.M., E.V.C., P.E.P., and N.M.B. analyzed data; E.N.M., E.V.C., P.E.P., and N.M.B. interpreted results of experiments; E.N.M. prepared figures; E.N.M. drafted manuscript; E.N.M., E.V.C., P.E.P., and N.M.B. approved final version of manuscript; E.V.C., P.E.P., and N.M.B. edited and revised manuscript.

REFERENCES

1. **Attig L, Solomon G, Ferezou J, Abdennebi-Najar L, Taouis M, Gertler A, Djiane J.** Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond)* 32: 1153–1160, 2008.
2. **Bertoni L, Ferretti M, Cavani F, Zavatti M, Resca E, Benelli A, Palumbo C.** Leptin increases growth of primary ossification centers in fetal mice. *J Anat* 215: 577–583, 2009.
3. **Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB.** 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: 2797–2805, 2004.
4. **Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP.** Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71: 1195–1204, 1992.
5. **Chen YW, Chenier I, Tran S, Scotcher M, Chang SY, Zhang SL.** Maternal diabetes programs hypertension and kidney injury in offspring. *Pediatr Nephrol* 25: 1319–1329, 2010.
6. **Coupé B, Amarger V, Grit I, Benani A, Parnet P.** Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 151: 702–713, 2010.
7. **Couvreur O, Ferezou J, Gripois D, Serougne C, Crépin D, Aubourg A, Gertler A, Vacher CM, 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.
8. **Desai M, Li T, Ross MG.** Hypothalamic neurosphere progenitor cells in low birth-weight rat newborns: neurotrophic effects of leptin and insulin. *Brain Res* 1378: 29–42, 2011.
9. **El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS.** Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 105: 1827–1832, 2000.
10. **Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA, Grove KL, Cowley MA.** Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 5: 181–194, 2007.
11. **Enriori PJ, Sinnayah P, Simonds SE, Garcia Rudaz C, Cowley MA.** Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J Neurosci* 31: 12189–12197, 2011.
12. **Ericsson A, Säljö K, Sjöstrand E, Jansson N, Prasad PD, Powell TL, Jansson T.** Brief hyperglycaemia in the early pregnant rat increases fetal weight at term by stimulating placental growth and affecting placental nutrient transport. *J Physiol* 581: 1323–1332, 2007.
13. **Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS.** Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1: 1311–1314, 1995.
14. **Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG, Bateson P.** Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proc Biol Sci* 272: 671–677, 2005.
15. **Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE.** Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R711–R722, 2010.
16. **Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG.** Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11073–11078, 1997.
17. **Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH.** Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 587: 905–915, 2009.
18. **Islam MS, Sjöholm A, Emilsson V.** Fetal pancreatic islets express functional leptin receptors and leptin stimulates proliferation of fetal islet cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 1246–1253, 2000.
19. **Islami D, Bischof P, Chardonnens D.** Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol Hum Reprod* 9: 395–398, 2003.
20. **Jansson N, Greenwood SL, Johansson BR, Powell TL, Jansson T.** Leptin stimulates the activity of the system A amino acid transporter in human placental villous fragments. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1205–1211, 2003.
21. **Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, Ericsson A, Palmberg I, Tranberg M, Ganapathy V, Powell TL, Jansson T.** Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J Physiol* 576: 935–946, 2006.
22. **Jéquier E.** Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann NY Acad Sci* 967: 379–388, 2002.
23. **Jones HN, Woollett LA, Barbour N, Prasad PD, Powell TL, Jansson T.** High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB J* 23: 271–278, 2009.
24. **Krechowec SO, Vickers M, Gertler A, Breier BH.** Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *J Endocrinol* 189: 355–363, 2006.
25. **Levin BE.** Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1107–1121, 2006.

26. **Levin BE, Govek E.** Gestational obesity accentuates obesity in obesity-prone progeny. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275: R1374–R1379, 1998.
27. **Makarova EN, Yakovleva TV, Shevchenko AY, Bazhan NM.** Pregnancy and lactation have anti-obesity and anti-diabetic effects in A^y/a mice. *Acta Physiol (Oxf)* 198: 169–177, 2010.
28. **Michaud EJ, Mynatt RL, Miltenberger RJ, Klebig ML, Wilkinson JE, Zemel MB, Wilkison WO, Woychik RP.** Role of the agouti gene in obesity. *J Endocrinol* 155: 207–209, 1997.
29. **Mingrone G, Manco M, Mora ME, Guidone C, Iaconelli A, Gniuli D, Leccesi L, Chiellini C, Ghirlanda G.** Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring. *Diabetes Care* 31: 1872–1876, 2008.
30. **Misra VK, Trudeau S.** The influence of overweight and obesity on longitudinal trends in maternal serum leptin levels during pregnancy. *Obesity (Silver Spring)* 19: 416–421, 2011.
31. **Morris MJ, Chen H.** Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. *Int J Obes (Lond)* 33: 115–122, 2009.
32. **Nilsson C, Swolin-Eide D, Ohlsson C, Eriksson E, Ho HP, Björntorp P, Holmäng A.** Reductions in adipose tissue and skeletal growth in rat adult offspring after prenatal leptin exposure. *J Endocrinol* 176: 13–21, 2003.
33. **Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, Reusens B.** Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia* 52: 1133–1142, 2009.
34. **Palou M, Priego T, Sánchez J, Palou A, Picó C.** Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. *Nutr Metab (Lond)* 7: 69, 2010.
35. **Palou M, Sánchez J, Rodríguez AM, Priego T, Picó C, Palou A.** Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: relationship with circulating leptin, insulin and glucose. *Cell Physiol Biochem* 23: 115–124, 2009.
36. **Pennington KA, Harper JL, Sigafoos AN, Beffa LM, Carleton SM, Phillips CL, Schulz LC.** Effect of food restriction and leptin supplementation on fetal programming in mice. *Endocrinology* 153: 4556–4567, 2012.
37. **Picó C, Oliver P, Sánchez J, Miralles O, Caimari A, Priego T, Palou A.** The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes* 31: 1199–1209, 2007.
38. **Rödel HG, Prager G, Stefanski V, von Holst D, Hudson R.** Separating maternal and litter-size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals. *Physiol Behav* 93: 826–834, 2008.
39. **Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, Piersma AH, Ozanne SE, Twinn DF, Remacle C, Rowlerson A, Poston L, Taylor PD.** Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 51: 383–392, 2008.
40. **Sánchez J, Priego T, García AP, Llopis M, Palou M, Picó C, Palou A.** 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: 1715–1728, 2012.
41. **Schulz LC, Schlitt JM, Caesar G, Pennington KA.** Leptin and the placental response to maternal food restriction during early pregnancy in mice. *Biol Reprod* 87: 120, 2012.
42. **Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJ, Badger TM.** Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R528–R538, 2008.
43. **Stocker C, O'Dowd J, Morton NM, Wargent E, Sennitt MV, Hislop D, Glund S, Seckl JR, Arch JR, Cawthorne MA.** Modulation of susceptibility to weight gain and insulin resistance in low birthweight rats by treatment of their mothers with leptin during pregnancy and lactation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 129–136, 2004.
44. **Stocker CJ, Wargent E, O'Dowd J, Cornick C, Speakman JR, Arch JR, Cawthorne MA.** Prevention of diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats following administration of leptin to their mothers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1810–R1818, 2007.
45. **Swart I, Jahng JW, Overton JM, Houpt TA.** Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R1020–R1026, 2002.
46. **Uçar B, Kirel B, Bör O, Kiliç FS, Doðruel N, Aydoðdu SD, Tekin N.** Breast milk leptin concentrations in initial and terminal milk samples: relationships to maternal and infant plasma leptin concentrations, adiposity, serum glucose, insulin, lipid and lipoprotein levels. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13: 149–156, 2000.
47. **Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R, Otani H.** Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. *Congenit Anom (Kyoto)* 47: 77–83, 2007.
48. **Vickers MH, Sloboda DM.** Leptin as mediator of the effects of developmental programming. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26: 677–687, 2012.
49. **von Versen-Höynck F, Rajakumar A, Parrott MS, Powers RW.** Leptin affects system A amino acid transport activity in the human placenta: evidence for STAT3 dependent mechanisms. *Placenta* 30: 361–367, 2009.
50. **Wang H, Storlien LH, Huang XF.** Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1352–E1359, 2002.
51. **White CL, Purpera MN, Morrison CD.** Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R1464–R1472, 2009.
52. **Wolff GL, Roberts DW, Mountjoy KG.** Physiological consequences of ectopic agouti gene expression: the yellow obese mouse syndrome. *Physiol Genomics* 1: 151–163, 1999.
53. **Yamashita H, Shao J, Ishizuka T, Klepcyk PJ, Muhlenkamp P, Qiao L, Hoggard N, Friedman JE.** Leptin administration prevents spontaneous gestational diabetes in heterozygous Lepr(db/+) mice: effects on placental leptin and fetal growth. *Endocrinology* 142: 2888–2897, 2001.

© 2015. Published by The Company of Biologists Ltd | The Journal of Experimental Biology (2015) 218, 50-58 doi:10.1242/jeb.110320

REVIEW

Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism

Anne Tarrade[1], Polina Panchenko[1], Claudine Junien[1,2] and Anne Gabory[1,*]

ABSTRACT

The recent and rapid worldwide increase in non-communicable diseases challenges the assumption that genetic factors are the primary contributors to such diseases. A new concept of the 'developmental origins of health and disease' (DOHaD) is at stake and therefore requires a paradigm shift. Maternal obesity and malnutrition predispose offspring to develop metabolic syndrome, a vicious cycle leading to transmission to subsequent generation(s), with differences in response and susceptibility according to the sex of the individual. The placenta is a programming agent of adult health and disease. Adaptations of placental phenotype in response to maternal diet and metabolic status alter fetal nutrient supply. This implies important epigenetic changes that are, however, still poorly documented in DOHaD studies, particularly concerning overnutrition. The aim of this review is to discuss the emerging knowledge on the relationships between the effect of maternal nutrition or metabolic status on placental function and the risk of diseases later in life, with a specific focus on epigenetic mechanisms and sexual dimorphism. Explaining the sex-specific causal variables and how males versus females respond and adapt to environmental perturbations should help physicians and patients to anticipate disease susceptibility.

KEY WORDS: DOHaD, Fetal programming, Placenta, Sex, Nutrition, Obesity, Maternal environment, Gestation

Introduction: developmental origins of health and disease

The recent and rapid worldwide increase in non-communicable diseases (NCDs) challenges the assumption that genetic factors are the primary contributors to such diseases (McAllister et al., 2009). The 'developmental origins of health and disease' (DOHaD) paradigm states that the environment during the periconception, gestation and lactation periods shapes the developing individuals, leading, in the case of a deleterious environment, to a predisposition to adult-onset diseases. This theory was popularised by D. J. Barker in the early 1990s (Barker, 1990) but the question had already been raised in earlier studies. In the 1960s and 1970s, different experiments on diverse mammalian species (rat, mouse, guinea pig, pig, etc.) showed that a reduction of maternal calorie or protein intake during pregnancy and lactation affects the growth capacity and cognitive ability of the offspring (reviewed in Roeder and Chow, 1972; McCance, 1976). Later, this concept was extended to phenotype in general, with a strong implication for quantitative traits in agriculture. An increasing number of studies pointed to the fact that maternal environment in cattle was an important parameter to fully express the genetically highly selected potential of the animals (Wallace et al., 2010; Jammes et al., 2011; Tanghe et al., 2014).

Male and female susceptibility to NCDs is well described. It appears that in the DOHaD context, the same environmental exposure may affect the long-term health of the offspring with a discrepancy between males and females in terms of the timing, onset and severity of outcomes (Gabory et al., 2009; Waddell and McCarthy, 2012; Bale, 2011; van Abeelen et al., 2011), often with a long latency (Barker, 1992; Walker and Ho, 2012). Sexual dimorphism is therefore an important component of the DOHaD.

Among the mechanisms proposed to elucidate this programming, epigenetics is a likely candidate, explaining gene expression alterations that may persist in the long term. Epigenetic marks are fully remodelled during the developmental period and therefore exposure to adverse environments during critical developmental windows can trigger long-lasting influences on the epigenome of the differentiating cell (Attig et al., 2010). The resulting changes in epigenetic marks may alter cell fate decisions and the growth and development of tissues and organs, and subsequently be responsible for inadequate responses to later challenges such as an obesogenic environment in a sex-specific manner (Gabory et al., 2011). Placental development and function is another important feature of the DOHaD phenomenon. As the interface between mother and fetus, the placenta plays a key role in fetal growth and development and, as such, affects the fetal programming underlying subsequent vulnerability in adulthood (Godfrey, 2002; Thornburg et al., 2010; Gabory et al., 2013).

The aim of this review is to discuss the emerging knowledge on the sex-specific relationships between diverse environmental influences on placental functions and the risk of diseases later in life, with a specific focus on epigenetic mechanisms and sexual dimorphism. The literature is wide on environmental effects (pollutants, various stresses, etc.): we will focus specifically on the effects of nutrition.

The placenta and its role in intrauterine programming

The placenta controls fetal development and growth through the transport of nutrients, respiratory gases and waste, and hormone synthesis. Adverse maternal conditions have been demonstrated to affect placental morphology, blood flow, feto-maternal exchanges and endocrine function, which modify placental efficiency corresponding to the ratio of fetal to placental weight. The effects on placental function are closely linked to the stage of development, the type of insult and the sex of the conceptus. Nevertheless, the placenta is capable of adapting to its environment to optimise its functions and promote fetal survival. In the case of placental failure, fetal growth could be altered, leading to a higher risk of developing metabolic syndrome in adulthood. In this context, the placenta can be considered as a central actor of fetal programming (Myatt, 2006; Jones et al., 2007; Fowden et al., 2009).

[1]INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78350 Jouy-en-Josas, France. [2]UVSQ, Université Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, France.

*Author for correspondence (anne.gabory@jouy.inra.fr)

The Journal of Experimental Biology

Several studies have established an effect of environmental stimuli on placental morphology. For example, placental manipulations are practiced in sheep farming; pregnant ewes that were moved from rich to poor pastures at mid-gestation were undernourished. In response to maternal undernutrition, the placental area was prone to increase. At late gestation, if ewes were moved to rich pastures, the expanded placenta contributed to obtaining larger lambs at birth (McCrabb et al., 1991; McCrabb et al., 1992). In an equine model to study intrauterine programming according to maternal size and weight, embryo transfers between different breeds were undertaken to induce a restricted fetal growth. Transfer of Thoroughbred embryos into a pony uterus led to a growth retardation associated with a decrease of the microcotyledon surface density on the allantochorion compared with Thoroughbred embryos transferred into Thoroughbred mares (Allen et al., 2002).

Vasculogenesis and angiogenesis are key events for the development of the placenta. Placental vascularisation progresses throughout gestation and is controlled by both physical and chemical factors such as oxygen and growth factors (Charnock-Jones et al., 2004; Kaufmann et al., 2004). The maternal environment is able to modulate placental vascularisation and alters the transport of respiratory oxygen and nutrients. In ewes underfeeding during gestation, placental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor transcripts was reduced by 50% on day 130 compared with ewes that received maintenance diet, while VEGF transcripts remained unchanged (Reynolds et al., 2005). Placental circulation through uterine and umbilical blood flow also contributes to the success of the pregnancy. In fact, abnormal blood flow was associated with intrauterine growth retardation (Kaponis et al., 2011). For example, overnourished adolescent sheep dams throughout pregnancy showed an increase of umbilical artery Doppler indices at mid-gestation, which preceded the reduction of fetal growth velocity (Carr et al., 2012).

The placenta is responsible for the transfer of substrates between maternal and fetal circulations. Substances have to cross several cellular layers, among them the trophoblast, through different transport mechanisms such as simple or facilitated diffusion or active transport, which depend on the type of components (Desforges and Sibley, 2010). Placental nutrient transfer capacity can be influenced by a wide range of factors such as placental surface area and thickness, the abundance of transporters, the gradient of concentrations between both maternal and fetal compartments, placental metabolism and utero-placental flows, themselves sensitive to environmental stimuli. For example, there is evidence that the expression and activity of system A, which is involved in neutral amino acid transport, is reduced in placentas from restricted fetal growth (Maiiendran et al., 1993; Jansson et al., 1998). Expression of glucose transporters is also affected by maternal metabolism. In the case of maternal food limitation during the last week of gestation in rats, the fetal growth restriction is associated with impairment of placental glucose transporter (GLUT-3) expression (Lesage et al., 2002).

The placenta is an endocrine organ, which secretes hormones in both maternal and fetal circulations. Some of them act on the maternal metabolism to facilitate glucose delivery to the fetus (progesterone, placental lactogen, placental variant of growth hormone). Another example is the insulin-like growth factor IGF-II, a cytokine, produced by the placenta, which is involved in feto-maternal exchanges specifically in the case of simple and facilitated diffusion of substrates (Sibley et al., 2004). Prostaglandins and corticotropin releasing hormone (CRH) have been described to control nutrient and oxygen supplies to the fetus by acting on fetal endocrine function, blood flow and myometrial contractility. Glucocorticoids are involved in organ development and maturation. Fetal exposure to glucocorticoids is closely linked to the maternal concentrations but also to the activity of 11-β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11βHSD2) expressed by the trophoblast. This enzyme converts the active glucocorticoids into inactive metabolites to protect the fetus against high concentrations of glucocorticoids. Moreover, inactivation of glucocorticoids is important to limit their effects on hormones that regulate nutrient supply (Fowden et al., 2008). These examples illustrate that hormones are able to modulate directly or indirectly the maternal and fetal metabolisms and nutrient transport in the placenta.

Maternal overnutrition/obesity and placental function

Obesity is defined as a body mass index (BMI) $\geq 30\ kg\ m^{-2}$. The prevalence of obesity has become a major health problem among women of childbearing age and reached 28.6% in the US population (National Center for Health Statistics, 2007).

During pregnancy, maternal obesity is associated with several outcomes for both mother and child: fetal growth abnormalities, macrosomia or intrauterine growth restriction, stillbirth, gestational diabetes mellitus (GDM), increased risk of caesarean section and pre-eclampsia. This maternal environment has profound long-term effects on the offspring, which are at greater risk of developing obesity and diabetes in childhood and adolescence (Catalano and Ehrenberg, 2006).

The metabolic diseases can take their origin in fetal adaptations to the adverse maternal environment. In the case of obese women, metabolic status during pregnancy is characterised by dyslipidaemia, hyperleptinaemia, hyperinsulinaemia and an exaggerated systemic inflammation (Ramsey and Glenn, 2002; Aye et al., 2014). Consequently, the feto-placental unit develops in an environment that predisposes the fetus to malprogramming.

Feto-placental weight

Maternal obesity can affect the feto-placental weight. In fact, in the Aberdeen Maternity and Neonatal Databank cohort including 37,482 women, placental weight and birth weight were highly correlated with increased maternal BMI, whereas placental efficiency decreased according to BMI (Wallace et al., 2012). Additionally, obese women have an increased risk of giving birth to a very low birth weight baby (McDonald et al., 2010). Finally, no alteration of fetal weight by maternal obesity was reported in another study, but it was associated with a decrease in placental efficiency (Dubé et al., 2012).

Biometry of the feto-placental unit has been obtained from different animal models of high maternal weight or obesity. Offspring from obese ewes increased their weight at mid-gestation whereas placentome weight was not altered (Zhu et al., 2009). In a mouse model, a high-fat diet administered before and throughout gestation resulted in fetal overgrowth associated with a normal placental weight (Jones et al., 2009). Mice fed a high-fat diet at mating had an increased body weight, while fetal weight was not changed at 15.5 days *post coitum* (Gallou-Kabani et al., 2010). In this last study, the diet affected placental weight and placental efficiency regardless of the sex of the fetuses. In rabbits, a high-fat diet before and throughout gestation induced high adiposity in the mothers, while their fetuses were of smaller weight, whereas placental efficiency remained unchanged (Tarrade et al., 2013). All these data demonstrate that variable results on fetal and placental weight have been reported, including a decrease or increase of weight or no effect, depending on species, diet composition and the time window of diet application.

Placental histology

Placental histology has been studied in the placenta of obese women. No placental maturity abnormalities, oedema, syncytial knots, fibrin deposition or chorangiosis have been shown. However, obese placentas displayed an increase in the muscularity of vessel walls in the villi (Roberts et al., 2011). In a non-human primate model where obesity was induced by a chronic high-fat diet, placentas showed an increase of infarction and chorionic villous calcification (Frias et al., 2011). Using transmission electron microscopy, an abnormal accumulation of lipid droplets has been described in placentas from rabbits fed a high-fat diet (Tarrade et al., 2013). In contrast, in placentas from mouse mothers fed a high-fat diet, no changes in the structure of the labyrinth and the spongiotrophoblast, or in the number and size of cells in the two layers were observed (Gabory et al., 2012).

Vascular function

In obese pregnant women, vascular function is impaired by impacting both endothelium and smooth muscle, which could explain the high risk of pre-eclampsia associated with obesity (Stewart et al., 2007), suggesting that placental vascularisation could be affected. In fact, chronic high-fat diet consumption before and throughout pregnancy reduced the uterine blood flow volume and the volume of blood flow on the fetal side of the placenta in primates (Frias et al., 2011). In a sheep model of overnutrition, the placenta demonstrated an impaired vascular development within the fetal cotyledon at an early stage (Redmer et al., 2009), which could explain the reduction of uterine and uteroplacental blood flow at mid- and late gestation (Wallace et al., 2002; Wallace et al., 2008). In another ewe model of obesity, a reduction of vascular density in cotyledonary tissue has been shown at mid-gestation (Zhu et al., 2009). Moreover, at this stage, cotyledonary arteriole diameters were greater in obese ewes, which could increase fetal growth, whereas cotyledonary arterial angiogenic factors from mid- to late gestation decreased in obese ewes, which could limit excessive placental vascular development (Ma et al., 2010).

Nutrient transport across the placenta

The transport of nutrients across the placenta depends on several mechanisms: the concentration gradients on the different placental sides, the expression and activity of transporters and the availability of substrates. Maternal obesity may affect placental transfer and nutrient availability. In obese women, placental transport and the metabolism of lipids have been described as being altered, which could contribute to the high adiposity in offspring during childhood (Dubé et al., 2012). Similar results from obese ewes have been published. High concentrations of cholesterol and triglycerides in both maternal and fetal blood increased placental fatty acid transporter in cotyledons at mid-gestation, which could explain fetal overgrowth and increased adiposity (Zhu et al., 2010b). In rodents, a maternal high-fat diet administered before and throughout pregnancy increased fetal growth and improved placental transport of glucose and neutral amino acids via an up-regulation of their transporters, GLUT-1 and SNAT-2, respectively (Jones et al., 2009). In contrast, a high-sugar and high-fat diet given throughout gestation reduced feto-placental growth at E16 but fetal weight was normalised at 19 days *post coitum*. Thus, the placenta adapts to its environment and increased glucose and amino acid transfer and expression of their transporters to promote fetal growth (Sferruzzi-Perri et al., 2013). Placental SNAT-4 activity, a major component of system A, was decreased in obese pregnant women, accompanied by maternal hyperleptinaemia and normal birth weight, and without insulin resistance (Farley et al., 2010). Activation of insulin/IGF-I and mTOR signalling was also studied. These signalling pathways are increased in placentas from obese women (without gestational diabetes) and contribute to stimulate system A amino acid transporter activity in the setting of normal feto-placental weight (Jansson et al., 2013). Altogether, these data suggest that maternal obesity is able to modify nutrient transfer across the placenta and thus impact fetal growth.

Inflammation

Maternal BMI is positively correlated with systemic inflammation including high levels of monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) and TNF-α (Aye et al., 2014), but also of IL-6 (Challier et al., 2008). Inflammation is not only systemic – it can also be located in the placenta. In fact, accumulation of macrophages in the stromal core of the villi and expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF-α have been described (Challier et al., 2008). Macrophage infiltration was also reported in the intravillous part of the placenta from obese baboons (Farley et al., 2009). In contrast, in obese women without insulin resistance, no difference in the number of macrophages within the placental villi was observed (Roberts et al., 2011). An increase of pro-inflammatory cytokines has been demonstrated in the placenta of both non-human primates fed a chronic high-fat diet (Frias et al., 2011) and obese ewes at mid-gestation (Zhu et al., 2010a). Moreover, in obese ewes, activation of Toll-like receptor-4 (TRL-4) through free fatty acids from the maternal compartment could activate NF-κB and JNK inflammatory signalling pathways (Zhu et al., 2010a). Other inflammatory pathways were activated according to maternal BMI such as p38-MAPK and STAT-3 (Aye et al., 2014). All these data indicate an exaggerated local inflammatory response in the placenta. Interestingly, the proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF-α stimulated the activity of system A amino acid transporter in trophoblast cell cultures (Jones et al., 2009), but also trophoblast fatty acid accumulation through IL-6 (Lager et al., 2011). Consequently, placental inflammatory status could contribute to an excessive nutrient transfer.

Nutrition, placental function and sexual dimorphism

The long-term effects of the same environmental insult, such as maternal unbalanced nutrition or maternal stress, can have various phenotypic effects on male and female offspring (Bale, 2011; Aiken and Ozanne, 2013). This difference has led many researchers to target their efforts exclusively to one sex, especially to males. The physiological and molecular basis for the observed sexual dimorphism in fetal programming is not understood: which aspects of sex-specific differences in development lead to this differential susceptibility to the same programming environment? The placenta has long been considered as a ‘sexless’ organ. Because of its fetal origin, the placenta in fact bears the same genetic information of sex as the fetus: XX or XY, and can also be differentially sensitive to fetal hormones (Gabory et al., 2013). Sex differences in the rate of fetal growth have long been recognised, but the sex of the embryo affects the size of both the fetus and the placenta, together with the ability of the placenta to respond to adverse stimuli (Clifton, 2010). The differences may appear very early during development, as it was found that in the bovine blastocyst, one-third of the gene expression already showed sex differences (Bermejo-Alvarez et al., 2010), and in cattle, rodents and humans, the rate of cell division and early development is faster in XY than in XX embryos (Mittwoch, 1993). Therefore, in the extraembryonic lineages as well as in the embryo proper, sex differences appear before gonadal

differentiation and hormone secretion. In many species, male placentas are bigger than female placentas or have a different shape (Eriksson et al., 2010). It was established in mice that these differences are independent of androgen effects (Ishikawa et al., 2003).

The majority of studies linking the sexually dimorphic placental response to nutrition and metabolism concern poor maternal nutrition. The Dutch famine at the end of the 2nd World War induced a decreased in placental size and area and a disruption of the fetus-to-placenta ratio index (FPI). The effect on the placental area was more severe for boys than girls (Roseboom et al., 2011). Moreover, the health outcomes were also different: in boys, changes in placental shape were associated with the development of the hypertension later in life, which was not the case in girls (van Abeelen et al., 2011). In ewes, placental restriction, induced by a surgical reduction of the number of caroncules, was associated with small size at birth and the appearance of more features of metabolic syndrome in males than in females at adulthood (Owens et al., 2007).

Fewer studies have focused on the potentially deleterious effects of maternal overnutrition, obesity or metabolic disturbances on the future health of the offspring (Zambrano and Nathanielsz, 2013). Fructose consumption is associated with the obesity epidemic (Vickers et al., 2011). In a rat model, adding fructose in drinking water during the first 10 days of pregnancy induced an increased caloric intake and a hyperinsulinaemia at term. The placental weight was decreased only in females, while fetal weight was not affected in either sex (Vickers et al., 2011). In humans, it was postulated that male babies need more fatty acids than female babies during development. Maternal obesity leads to a decrease in oleic acid uptake in the placenta of boys and an increase in that of girls. The expression of the CD36 fatty acid transporter and the binding protein FABP5 was decreased in the placenta of boys and unaffected in that of girls (Brass et al., 2013). Rabbit females fed a lipid- and cholesterol-enriched diet developed high adiposity and dyslipidaemia and their offspring were overweight at adulthood, which was associated with hypertension (Picone et al., 2011). Interestingly, a specific sexually dimorphic response to maternal diet was observed in the placenta. The placentas of females presented an increased lipid storage compared with those of males, along with a differential gene expression between the two sexes. In contrast, fetuses displayed a dyslipidaemia that affected more males than females. Therefore, there was a physiological adaptation, with a relative protection of the female fetuses from developing dyslipidaemia (Tarrade et al., 2013). Finally, a recent study showed that maternal obesity in the mouse induced a reduction in placenta labyrinth thickness and cell proliferation. Moreover, inflammation in the placenta was increased in late gestation, with a sex-specific effect: placentas of males showed greater inflammation and macrophage activation than those of females (Kim et al., 2014).

Very few studies have investigated the sex-specific response to maternal diet at the transcriptomic level. In human successful full-term pregnancy, Sood and colleagues identified some gene sets that were correlated with the sex of the fetus in the placenta. A lot of these gene sets were located on the X (10/34 in females) and Y (3/7 in males) chromosomes but the majority were on autosomes. The genes that were more expressed in the placentas of females included genes implicated in immune regulation. This suggests that sex-specific placental function and gene expression might have a role in the differences between males and females observed in fetal development and physiology (Sood et al., 2006). This human study did not take into account maternal diet and this aspect was provided by animal model investigations. In a first model, female mice were challenged with either a low-fat or a high-fat diet from week 5 for 30 weeks before breeding, inducing underweight and overweight, respectively. A striking sexual dimorphism was observed by microarray assay in the E12.5 placental gene expression: each diet led to a sex-specific response and more genes were deregulated in females than in males under both diets (Mao et al., 2010). The authors suggested that the increased female sensitivity to maternal diet might buffer the deleterious environment to protect the female fetuses, leading to a decreased negative programming impact in adulthood. In another mouse model, the females were fed a control or a high-fat diet from gestation days E0.5 to E15.5. Microarray experiments showed that the expression was sexually dimorphic under both diets and that the response to a maternal high-fat diet was sexually dimorphic. The differences were not only quantitative but also remarkably qualitative. The biological functions and networks of dysregulated genes clearly differed between the sexes: mainly cell signalling involving immune cells, and uptake and metabolism of amino acids for females, and development and function of the vascular system, and uptake and metabolism of glucose and fatty acids for males (Gabory et al., 2012). In this model, there was no evidence for a greater reactivity in female placentas to maternal high-fat diet, in terms of placental and fetal growth or the number of dysregulated genes. Finally, in a non-human primate model of nutrient restriction, food intake of the pregnant baboon female was reduced by 30% from day 30 of gestation to day 165 (close to term, day 183). Again, a sex-specific response was observed using microarray assay. Female placentas exhibited a highly coordinated response, including upregulation of genes related to programmed cell death and downregulation of genes associated with cell proliferation. The male placental transcriptome appeared less responsive in terms of the number of affected genes and pertinent pathways (Cox et al., 2013).

Altogether, when the sex of the embryo is taken into account, most human and animal studies show sexual dimorphism in placental function and the response to maternal diet. A dominant concept in the literature is that female and male fetuses have different growth strategies, leading to differential survival and pregnancy outcomes. The greater sensitivity of females to the maternal environment would lead to modest growth changes and finally a better adaptation to deleterious signals such as maternal asthma, and a restricted or high-fat diet. Male fetuses, in contrast, induce changes in minimum gene expression and biological processes, leading to poor adaptation to an adverse environment and a more divergent growth curve (Clifton, 2010; Eriksson et al., 2010; Cox et al., 2013). Other reports show no difference in reactivity between the sexes but clearly different biological functions (Gabory et al., 2012). In these cases, it is difficult to say whether one sex copes better than the other. Differences in adaptation between males and females may therefore be context, species and stage specific. The molecular mechanisms underlying this sexually dimorphic adaptive response are largely unknown and more detailed molecular analysis will be of great interest to explain the sex-specific adaptive phenotypes and pathologies in adulthood.

Epigenetics and nutrition

More and more studies are converging to propose that epigenetics may be one of the key molecular mechanisms underlying the developmental programming of the phenotype. Epigenetics refers to the field of science studying the heritable mechanisms regulating gene expression without changing the DNA sequence itself. There are two main mechanisms: covalent modification of the chromatin and non-coding RNA. The principal chromatin modifications are

epigenetic marks: DNA methylation, which takes place at cytosines, mostly in CpG dinucleotide configurations, and post-translational modifications including methylation and acetylation of the histone proteins forming the nucleosome. These modifications are set-up or removed by the enzymes of the epigenetic machinery, leading to a dynamic state of the chromatin. The combination of all epigenetic marks over the genome constitutes the epigenome. The epigenetic landscapes are transmitted through cell division, leading to a memory of the cell identity, which leads to the notion of their 'heritability'. A more detailed description of epigenetic marks is introduced by Daniel and Tollesfbol in this issue (Daniel and Tollesfbol, 2015).

Epigenetics, because of its dynamic nature, can be sensitive to the environment and there is an obvious link between nutrition, energy metabolism and epigenetic processes (Delage and Dashwood, 2008; Choi and Friso, 2010; Gabory et al., 2011; Lillycrop and Burdge, 2012; Kaelin and McKnight, 2013; Vanhees et al., 2014). Briefly, nutrients and their metabolites can be direct substrates of the epigenetic machinery enzymes that appose the epigenetic marks. *S*-Adenosine methionine (SAM) is the donor of -CH_3 (methyl) groups for DNA and histone methylation. SAM is part of the one-carbon metabolism involving the folate cycle. This involves different dietary micronutrients, such as vitamin B9 (folate) but also vitamins B2, B6 and B12, methionine, betaine, choline or zinc (Anderson et al., 2012). Acetyl-CoA is the source of -$COCH_3$ for the histone acetylation reaction. It is a very important metabolic hub and its biogenesis can be obtained by many different pathways, particularly in glucose, fatty acid and amino acid metabolism. Nutrients and their metabolites can also be direct activators or inhibitors of the epigenetic machinery enzymes. Finally, nutrients and their metabolites can be substrates for membrane and nuclear receptors, thus leading to the local modification of the chromatin on the target gene sequences via different cell signalling pathways (Gabory et al., 2011).

There are two main periods of major chromatin remodelling: gametogenesis, to reset the epigenetic pattern from the primary germ cell into gamete cell identity, and conceptus development, to erase the gamete epigenetic identity towards totipotent and then cell type-specific information. Therefore, these periods are particular time windows during which the sensitivity of the epigenetic programme to the environment is important: a perturbation of the erasure and resetting of the epigenetic patterns can have long-lasting consequences on the development and function of the tissues and therefore long-term effects on phenotype and diseases (Attig et al., 2010).

Epigenetics, placental function and nutrition

From the first step of trophoblast lineage differentiation, there is an asymmetry in the apposition of the epigenetic marks compared with the embryonic lineage. These differences appear to persist throughout embryonic development (Nelissen et al., 2011; Rugg-Gunn, 2012). Global DNA methylation is lower in the trophectoderm than in the inner cell mass of the blastocyst, and this lower methylation is retained in the extra-embryonic tissue compared with the somatic tissue (Santos et al., 2002). However, this does not mean that DNA methylation is not a factor contributing to placental function. It is indeed required for placental formation and function, as mice mutants of DNA methyltransferases (*Dnmt*) show important placental defects. Histone modifications also present distribution asymmetry between the two first lineages in the blastocyst and this pattern is conserved throughout gestation. The trophectoderm blastomeres appear to be depleted in H3K27 methylation (methylation is apposed on the lysine residue in position 27 of histone H3), H3K4 and H4K16 acetylation marks compared with the inner cell mass at the global level. Another important mark might be H3K9 methylation, as the Kmt1a (Suv39h1) methyltransferase has a role in trophectoderm cell fate identity maintenance *in vitro* and *in vivo*. Histone modifications are crucial for establishment of the trophoblast lineage, maintenance of this extra-embryonic identity and placental function (reviewed in Rugg-Gunn, 2012).

Another noteworthy epigenetic feature in the placenta is genomic imprinting. This is an epigenetic mechanism leading to a parent-of-origin-specific gene expression. The apposition of specific epigenetic marks in the two separate germ lines confers a memory of this origin on a region called the imprinting centre that leads to a maternal- or paternal-specific expression of the imprinted genes. For example, the *H19/Igf2* locus is methylated during spermatogenesis and protected from DNA methylation during oogenesis, leading to the expression of *H19* on the maternal allele and *Igf2* on the paternal allele (Gabory et al., 2010). Genomic imprinting is present in most, if not all, somatic and extra-embryonic tissues but its importance in placental development and function is highlighted by two facts. First, its emergence during evolution parallels the emergence of viviparity (Renfree et al., 2013). Second, a substantial number of genes are imprinted only in the placenta and exhibit a classic bi-allelic expression in somatic tissues (Wagschal and Feil, 2006). The epigenetic mechanisms governing the monoallelic expression of these genes in the placenta might be different from those in somatic tissue, with greater importance for histone modifications in the extra-embryonic lineages than in the proper embryo (Lewis et al., 2004; Umlauf et al., 2004). The specific feature of genomic imprinting and its particularities in the placenta led to the hypothesis that it might 'buffer' the environmental impact and imprinted genes appeared to be good candidates to mediate nutrition-linked transgenerational effects on growth (Pembrey, 1996), and hence to participate in the DOHaD process. On the one hand, imprinted genes may not be more susceptible to alteration related to maternal nutrition and metabolic states. They have been particularly studied because the regulatory sequences and epigenetic mechanisms implicated in the regulation of their expression are well described. The whole genome is affected. But on the other hand, their expression is finely tuned by epigenetic marks and, consequently, a small change in these marks may be transmitted to the next cellular generations and have a real impact on gene expression and tissue function. Therefore, these genes might not be specific targets of nutrition but sentinels of a nutritional and metabolic programming.

Because of the role of the placenta and of epigenetic processes in fetal programming, and given the placenta's unique position at the materno-fetal interface, a growing number of studies are examining this organ and these processes either as biomarkers for early perturbation linked with adult-onset diseases or from a fundamental mechanistic point of view. As the impact of exposure to toxicants (cigarette smoking, toxic metals, etc.) or maternal stress on DNA methylation of specific candidate genes or on the whole DNA methylome, as well as on microRNA expression, has been reported in this issue (Marsit, 2015) and elsewhere (Maccani et al., 2010; Bale, 2011; Lee and Ding, 2012; Monk et al., 2012; Suter and Aagaard, 2012), we will focus on the very few publications about maternal nutrition and metabolism.

Gestational diabetes mellitus and obesity

The incidence of women with gestational diabetes mellitus (GDM) and obesity is increasing. It is therefore essential to understand how these factors can impact development and predispose people to metabolic disorders in the long term.

Placenta DNA methylation at the global level was measured by the luminometric methylation assay (LUMA) in an American cohort of pregnancies complicated by GDM, pre-eclampsia or obesity (Nomura et al., 2014). This technique measures methylation of CG sites in the CCGG position at the global genome level. Placental methylation levels were lower in patients with GDM or pre-eclampsia while they were higher in patients with obesity. The differences were modest (−4.35% for GDM, *N*=8 versus 24 controls, and +2.46% for obesity, *N*=18 versus 32 controls) but as it is global methylation, which reflects CG-rich region methylation such as CpG islands or gene promoters, it can be considered as a substantial difference throughout the genome at large. This implies that maternal metabolism during pregnancy can impact whole-genome epigenetic marks (Nomura et al., 2014) but this does not allow comprehensive interpretation of the programming of adult diseases. With that goal, gene-specific methylation studies have been carried out.

A Canadian team has studied placental methylation of candidate genes in a cohort of women with impaired glucose tolerance [IGT, as defined by a 2 h post-75 g oral glucose tolerance test (OGTT), glycaemia ≥7.8 nmol l^{-1}], which is a clinical standard of GDM (Ruchat et al., 2013a). While they could not find a statistical link between IGT and term placenta DNA methylation, they did find a significant correlation between 2 h post-OGTT glycaemia and DNA methylation at the *LEPTIN*, *ADIPONECTIN* and *ABCA1* genes. For the *IGF1R* and *IGFBP3* genes, DNA methylation levels were lower in IGT placentas and correlated with the 2 h post-OGTT glycaemia (−4.3 and −2.5 percentage points for *IGF1R* and *IGFBP3*, respectively, *N*=102 normal glucose tolerance and 28 IGT placentas). The *LEPTIN* gene promoter methylation was also measured in the Rhode Island Child Health Study (Lesseur et al., 2014). Global promoter methylation was higher in the placenta of obese mothers and this association was mediated by GDM (+2.5 percentage points difference between GDM patients, *N*=47, and controls, *N*=432). Interestingly, *LEPTIN* promoter methylation is higher in the placentas of males than females (+2.3 percentage point difference). A German team studied DNA methylation of 16 candidate regions in women with diet- or insulin-treated GDM (El Hajj et al., 2013). They found a decrease in placental DNA methylation in four genes and two repeated regions. Significantly, *MEST* gene DNA methylation was downregulated by 7 percentage points in GDM (*N*=80 GDM patients and 83 insulin-dependent GDM patients and *N*=57 controls). The authors also observed a significant decrease in blood *MEST* methylation (3 percentage points, *N*=37 obese patients and 37 controls) in adults with morbid obesity, supporting the idea that intrauterine exposure to GDM may have effects on the epigenome of the offspring throughout life.

In the Canadian cohort, DNA methylation was also measured at 485,000 CpG sites, using the Infinium HumanMethylation450 BeadChips platform (Ruchat et al., 2013b). CpGs in 3271 genes were found to be affected by maternal GDM. Interestingly, these genes were principally associated with pathways implicated in metabolic diseases (cardiovascular diseases and metabolic disorders are the top pathways in the bioinformatical studies). Moreover, in almost 10% of these genes, the methylation levels were correlated with newborn weight, which is itself a marker of predisposition to adult metabolic diseases.

Taken together, these data support the implication of placental epigenetic adaptations in genes involved in fetal growth, and energy, glucose and lipid metabolism in response to maternal glucose concentration and GDM. We can discuss the accuracy of these epigenetic studies, regarding the small differences that were found of between 2.3 and 7 percentage points. Methylation is an on or off feature and therefore the percentage of methylation more or less reflects the percentage of cells in which the sequence is methylated in the tissue. Thus 2.3–7% of the placental cells are affected by GDM or obesity: is it biologically relevant? If the difference is diluted in the whole tissue, the effects might be restrained or absent. However, if the differences were restricted to a small number of cells with a specific role, the effects would be substantial. Expression studies linking the methylation difference to expression change would answer this question but this is unfortunately not systematically investigated. We can also be interested in these differences not from a mechanistic point of view but as biomarkers. The variations that are described are statistical, not systematic, and inter-individual variation is quite important. Finally, large prospective studies will be needed to prove that such placental epigenetic changes are indeed associated with changes in disease susceptibility in adulthood.

Intrauterine calorie restriction

Intrauterine calorie restriction is associated with growth retardation in newborn human and animal models. In rodents, it has been associated with various features of metabolic syndrome in offspring, such as glucose intolerance, increased fat mass and hypercholesterolaemia. Using RNA-sequencing and reduced representation bisulphite sequencing (RRBS) techniques, DNA methylation and gene expression were studied in the placenta of calorie-restricted (CR) mice (Chen et al., 2013). At the global level, CR placentas were hypomethylated and this feature was interestingly more pronounced in placentas of males than females. The changes in DNA methylation in response to maternal CR had a strong sex-specific component. Firstly, differentially methylated regions between CR and control placentas are not the same in placentas of males and females. Secondly, the networks associated with the differentially methylated genes were also different: linked with lipid metabolism, nervous system development and developmental disorders in females and linked with cell and organ morphology in males. Finally, a candidate gene approach identified imprinted genes and microRNA coding gene with differential methylation (Chen et al., 2013). For further studies in this field, it would be necessary to investigate how placental histone marks are affected by maternal caloric restriction.

Effect of a high-fat diet

In a mouse model, pregnant females were fed a high-fat diet, from 0.5 to 15.5 days *post coitum*, the middle of the fetal period. We compared the gene expression patterns of 20 imprinted genes and analysed DNA methylation in the placentas from male and female fetuses (Gallou-Kabani et al., 2010). A high-fat diet during gestation triggers the deregulation of imprinted genes, among which the *Igf2r* cluster, which plays an important role in the control of many cellular, metabolic and physiological functions potentially involved in adaptation and/or evolution, was particularly significant. We analysed the DNA methylation on the imprinting control region of this locus and observed sex- and diet-specific differential methylation of CpGs in two subregions. While we cannot conclude there is a direct link between the observed differences in DNA methylation and gene expression, bioinformatic analysis suggested that the differentially methylated CpGs lie within recognition elements or binding sites for transcription factors and factors involved in chromatin remodelling (Gallou-Kabani et al., 2010). Using transcriptomic datas from the same placentas, we observed a downregulation of three important epigenetic modifiers in the placentas of fetuses from mothers fed a high-fat diet. *Kmt1a* and *Kmt1b* (*Suv39h1/h2*) are H3K9 methyltransferases (Gabory et al.,

2012). Interestingly, *Dnmt3l*, a cofactor of the Dnmt3 enzymes, was downregulated specifically in placentas of females but not males. Placental global DNA methylation, as assessed by the LUMA technique, was also downregulated in females fed a high-fat diet compared with those fed a control diet.

Finally, we observed that the expression of the *Kdm5c* and *Kdm5d* genes, which encode the Jarid1c and Jarid1d H3K4 demethylases, were sexually dimorphic (Gabory et al., 2012). These genes are paralogues on the X- and Y-chromosomes. The *Kdm5c* gene is on the X-chromosome and escapes X-chromosome inactivation. We indeed found that it was more expressed in placentas of females than males, regardless the maternal diet. *Kdm5d* is Y-linked and therefore only expressed in placentas of males. In our model, we found that the *Kdm5d* gene expression in males was not able to compensate for the expression of *Kdm5c*, as the expression, studied by RT-qPCR with primers recognising both *Kdm5c/5d* transcripts, was still higher in females than in males (Gabory et al., 2013). Whether the two proteins have the same function or can be associated with different partners, therefore targeting different regions on the genome, is unclear. The epigenetic enzymes could therefore mark the epigenome in a sex-specific manner, at both the quantitative and qualitative levels (Xu et al., 2002).

Conclusions

Altogether, the data presented in this review converge on the fact that adaptation in placental phenotype in response to maternal diet and metabolic status (GDM, obesity, undernutrition, etc.) alters fetal nutrient supply, leading to a higher susceptibility to develop metabolic disorders under adverse adult life conditions, such as an obesogenic diet and/or morbidity.

Sexual dimorphism is another very important aspect of the DOHaD process that is increasingly being taken into account. It is becoming clear that the placenta reacts differently to the same environment depending on the sex of the fetus. The sex specificity of the adult-onset phenotype is therefore already partly shaped *in utero* and the placenta is at stake in this sex-specific feature. Finally, the fetal programming processes and the sex specificities imply important epigenetic mechanisms that are, however, still poorly documented. Effort should be concentrated not only on the observation of sex-specific features but also, and more importantly, on the understanding of the underlying mechanisms. A possible process might be that the sex-specific epigenome, apposed by epigenetic enzymes encoded by genes on the X-/Y-chromosome, such as *Kdm5c/5d*, *Utx (Kdm6a)/Uty*, *MeCP2*, would be differentially affected by maternal diet and metabolism leading to male and female divergence in programming. Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, multiple histone modifications and non-coding RNAs, governing placental differentiation and function, and therefore the fetal growth and phenotype, could contribute in this programming process. Maternal metabolic status can impact epigenetic mark apposition and memory, which could lead to an altered placental gene expression and function with direct consequences for fetal tissue development, and thus potentially have an impact on adult offspring phenotype.

Explaining the sex-specific causal variables and how males versus females respond and adapt to environmental perturbations should help physicians and patients anticipate disease susceptibility.

Acknowledgements

The authors thanks Hélène Jammes and Hélène Kiefer for our helpful discussion regarding epigenetics.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

A.T. and A.G. wrote the article, P.P. and C.J. revised the manuscript.

Funding

This work was supported by INRA with dedicated help from the INRA AlimH and PhASE departments, the Fondation Coeur et Arteres (FCA Nu 05-T4), the Institut Benjamin Delessert, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR 06-PNRA-022-01) and Contrat Cadre d'Aide au Projet d'Innovation Strategique Industrielle 'IT-Diab' OSEO-ISI (18/12/2008). P.E.P. has a doctoral grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche awarded by the UPMC, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

References

Aiken, C. E. and Ozanne, S. E. (2013). Sex differences in developmental programming models. *Reproduction* **145**, R1-R13.

Allen, W. R., Wilsher, S., Turnbull, C., Stewart, F., Ousey, J., Rossdale, P. D. and Fowden, A. L. (2002). Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* **123**, 445-453.

Anderson, O. S., Sant, K. E. and Dolinoy, D. C. (2012). Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 853-859.

Attig, L., Gabory, A. and Junien, C. (2010). Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **13**, 284-293.

Aye, I. L., Lager, S., Ramirez, V. I., Gaccioli, F., Dudley, D. J., Jansson, T. and Powell, T. L. (2014). Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. *Biol. Reprod.* **90**, 129.

Bale, T. L. (2011). Sex differences in prenatal epigenetic programming of stress pathways. *Stress* **14**, 348-356.

Barker, D. J. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* **301**, 1111.

Barker, D. J. (1992). The fetal origins of diseases of old age. *Eur. J. Clin. Nutr.* **46 Suppl. 3**, S3-S9.

Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P. and Gutierrez-Adan, A. (2010). Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 3394-3399.

Brass, E., Hanson, E. and O'Tierney-Ginn, P. F. (2013). Placental oleic acid uptake is lower in male offspring of obese women. *Placenta* **34**, 503-509.

Carr, D. J., Aitken, R. P., Milne, J. S., David, A. L. and Wallace, J. M. (2012). Fetoplacental biometry and umbilical artery Doppler velocimetry in the overnourished adolescent model of fetal growth restriction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **207**, 141.e6-141.e15.

Catalano, P. M. and Ehrenberg, H. M. (2006). The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG* **113**, 1126-1133.

Challier, J. C., Basu, S., Bintein, T., Minium, J., Hotmire, K., Catalano, P. M. and Hauguel-de Mouzon, S. (2008). Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* **29**, 274-281.

Charnock-Jones, D. S., Kaufmann, P. and Mayhew, T. M. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* **25**, 103-113.

Chen, P. Y., Ganguly, A., Rubbi, L., Orozco, L. D., Morselli, M., Ashraf, D., Jaroszewicz, A., Feng, S., Jacobsen, S. E., Nakano, A. et al. (2013). Intrauterine calorie restriction affects placental DNA methylation and gene expression. *Physiol. Genomics* **45**, 565-576.

Choi, S. W. and Friso, S. (2010). Epigenetics: a new bridge between nutrition and health. *Adv Nutr* **1**, 8-16.

Clifton, V. L. (2010). Review: sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta* **31 Suppl.**, S33-S39.

Cox, L. A., Li, C., Glenn, J. P., Lange, K., Spradling, K. D., Nathanielsz, P. W. and Jansson, T. (2013). Expression of the placental transcriptome in maternal nutrient reduction in baboons is dependent on fetal sex. *J. Nutr.* **143**, 1698-1708.

Daniel, M. and Tollefsbol, T. O. (2015). Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. *J. Exp. Biol.* **218**, 59-70.

Delage, B. and Dashwood, R. H. (2008). Dietary manipulation of histone structure and function. *Annu. Rev. Nutr.* **28**, 347-366.

Desforges, M. and Sibley, C. P. (2010). Placental nutrient supply and fetal growth. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 377-390.

Dubé, E., Gravel, A., Martin, C., Desparois, G., Moussa, I., Ethier-Chiasson, M., Forest, J. C., Giguère, Y., Masse, A. and Lafond, J. (2012). Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-term placenta. *Biol. Reprod.* **87**, 14.

El Hajj, N., Pliushch, G., Schneider, E., Dittrich, M., Müller, T., Korenkov, M., Aretz, M., Zechner, U., Lehnen, H. and Haaf, T. (2013). Metabolic programming of MEST DNA methylation by intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus. *Diabetes* **62**, 1320-1328.

Eriksson, J. G., Kajantie, E., Osmond, C., Thornburg, K. and Barker, D. J. (2010). Boys live dangerously in the womb. *Am. J. Hum. Biol.* **22**, 330-335.

Farley, D., Tejero, M. E., Comuzzie, A. G., Higgins, P. B., Cox, L., Werner, S. L., Jenkins, S. L., Li, C., Choi, J., Dick, E. J., Jr et al. (2009). Feto-placental adaptations to maternal obesity in the baboon. *Placenta* **30**, 752-760.

Farley, D. M., Choi, J., Dudley, D. J., Li, C., Jenkins, S. L., Myatt, L. and Nathanielsz, P. W. (2010). Placental amino acid transport and placental leptin resistance in pregnancies complicated by maternal obesity. *Placenta* **31**, 718-724.
Fowden, A. L., Forhead, A. J., Coan, P. M. and Burton, G. J. (2008). The placenta and intrauterine programming. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 439-450.
Fowden, A. L., Sferruzzi-Perri, A. N., Coan, P. M., Constancia, M. and Burton, G. J. (2009). Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *J. Physiol.* **587**, 3459-3472.
Frias, A. E., Morgan, T. K., Evans, A. E., Rasanen, J., Oh, K. Y., Thornburg, K. L. and Grove, K. L. (2011). Maternal high-fat diet disturbs uteroplacental hemodynamics and increases the frequency of stillbirth in a nonhuman primate model of excess nutrition. *Endocrinology* **152**, 2456-2464.
Gabory, A., Attig, L. and Junien, C. (2009). Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol. Cell. Endocrinol.* **304**, 8-18.
Gabory, A., Jammes, H. and Dandolo, L. (2010). The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *BioEssays* **32**, 473-480.
Gabory, A., Attig, L. and Junien, C. (2011). Developmental programming and epigenetics. *Am. J. Clin. Nutr.* **94 Suppl.**, 1943S-1952S.
Gabory, A., Ferry, L., Fajardy, I., Jouneau, L., Gothié, J. D., Vigé, A., Fleur, C., Mayeur, S., Gallou-Kabani, C., Gross, M. S. et al. (2012). Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PLoS ONE* **7**, e47986.
Gabory, A., Roseboom, T. J., Moore, T., Moore, L. G. and Junien, C. (2013). Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biol. Sex Differ.* **4**, 5.
Gallou-Kabani, C., Gabory, A., Tost, J., Karimi, M., Mayeur, S., Lesage, J., Boudadi, E., Gross, M. S., Taurelle, J., Vigé, A. et al. (2010). Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS ONE* **5**, e14398.
Godfrey, K. M. (2002). The role of the placenta in fetal programming – a review. *Placenta* **23 Suppl. A**, S20-S27.
Ishikawa, H., Rattigan, A., Fundele, R. and Burgoyne, P. S. (2003). Effects of sex chromosome dosage on placental size in mice. *Biol. Reprod.* **69**, 483-488.
Jammes, H., Junien, C. and Chavatte-Palmer, P. (2011). Epigenetic control of development and expression of quantitative traits. *Reprod. Fertil. Dev.* **23**, 64-74.
Jansson, T., Scholtbach, V. and Powell, T. L. (1998). Placental transport of leucine and lysine is reduced in intrauterine growth restriction. *Pediatr. Res.* **44**, 532-537.
Jansson, N., Rosario, F. J., Gaccioli, F., Lager, S., Jones, H. N., Roos, S., Jansson, T. and Powell, T. L. (2013). Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 105-113.
Jones, H. N., Powell, T. L. and Jansson, T. (2007). Regulation of placental nutrient transport – a review. *Placenta* **28**, 763-774.
Jones, H. N., Woollett, L. A., Barbour, N., Prasad, P. D., Powell, T. L. and 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.* **23**, 271-278.
Kaelin, W. G., Jr and McKnight, S. L. (2013). Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell* **153**, 56-69.
Kaponis, A., Harada, T., Makrydimas, G., Kiyama, T., Arata, K., Adonakis, G., Tsapanos, V., Iwabe, T., Stefos, T., Decavalas, G. et al. (2011). The importance of venous Doppler velocimetry for evaluation of intrauterine growth restriction. *J. Ultrasound Med.* **30**, 529-545.
Kaufmann, P., Mayhew, T. M. and Charnock-Jones, D. S. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* **25**, 114-126.
Kim, D. W., Young, S. L., Grattan, D. R. and Jasoni, C. L. (2014). Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biol. Reprod.* **90**, 130.
Lager, S., Jansson, N., Olsson, A. L., Wennergren, M., Jansson, T. and Powell, T. L. (2011). Effect of IL-6 and TNF-α on fatty acid uptake in cultured human primary trophoblast cells. *Placenta* **32**, 121-127.
Lee, S. A. and Ding, C. (2012). The dysfunctional placenta epigenome: causes and consequences. *Epigenomics* **4**, 561-569.
Lesage, J., Hahn, D., Léonhardt, M., Blondeau, B., Bréant, B. and Dupouy, J. P. (2002). Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. *J. Endocrinol.* **174**, 37-43.
Lesseur, C., Armstrong, D. A., Paquette, A. G., Li, Z., Padbury, J. F. and Marsit, C. J. (2014). Maternal obesity and gestational diabetes are associated with placental leptin DNA methylation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **211**, 654.e1-9.
Lewis, A., Mitsuya, K., Umlauf, D., Smith, P., Dean, W., Walter, J., Higgins, M., Feil, R. and Reik, W. (2004). Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat. Genet.* **36**, 1291-1295.
Lillycrop, K. A. and Burdge, G. C. (2012). Epigenetic mechanisms linking early nutrition to long term health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 667-676.
Ma, Y., Zhu, M. J., Zhang, L., Hein, S. M., Nathanielsz, P. W. and Ford, S. P. (2010). Maternal obesity and overnutrition alter fetal growth rate and cotyledonary vascularity and angiogenic factor expression in the ewe. *Am. J. Physiol.* **299**, R249-R258.
Maccani, M. A., Avissar-Whiting, M., Banister, C. E., McGonnigal, B., Padbury, J. F. and Marsit, C. J. (2010). Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with downregulation of miR-16, miR-21, and miR-146a in the placenta. *Epigenetics* **5**, 583-589.
Maiiendran, D., Donnai, P., Glazier, J. D., D'Souza, S. W., Boyd, R. D. and Sibley, C. P. (1993). Amino acid (system A) transporter activity in microvillous membrane vesicles from the placentas of appropriate and small for gestational age babies. *Pediatr. Res.* **34**, 661-665.
Mao, J., Zhang, X., Sieli, P. T., Falduto, M. T., Torres, K. E. and Rosenfeld, C. S. (2010). Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 5557-5562.
Marsit, C. J. (2015). Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *J. Exp. Biol.* **218**, 71-79.
McAllister, E. J., Dhurandhar, N. V., Keith, S. W., Aronne, L. J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R. M., Biggio, J., Boggiano, M. M., Eisenmann, J. C. et al. (2009). Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 868-913.
McCance, R. A. (1976). Critical periods of growth. *Proc. Nutr. Soc.* **35**, 309-313.
McCrabb, G. J., Egan, A. R. and Hosking, B. J. (1991). Maternal undernutrition during mid-pregnancy in sheep. Placental size and its relationship to calcium transfer during late pregnancy. *Br. J. Nutr.* **65**, 157-168.
McCrabb, G. J., Egan, A. R. and Hosking, B. J. (1992). Maternal undernutrition during mid-pregnancy in sheep; variable effects on placental growth. *J. Agric. Sci.* **118**, 127-132.
McDonald, S. D., Han, Z., Mulla, S., Beyene, J.; Knowledge Synthesis Group (2010). Overweight and obesity in mothers and risk of preterm birth and low birth weight infants: systematic review and meta-analyses. *BMJ* **341**, c3428.
Mittwoch, U. (1993). Blastocysts prepare for the race to be male. *Hum. Reprod.* **8**, 1550-1555.
Monk, C., Spicer, J. and Champagne, F. A. (2012). Linking prenatal maternal adversity to developmental outcomes in infants: the role of epigenetic pathways. *Dev. Psychopathol.* **24**, 1361-1376.
Myatt, L. (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *J. Physiol.* **572**, 25-30.
National Center for Health Statistics (2007). *Health, United States, 2007: With Chartbook on Trends in the Health of Americans*, pp. 88-292. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics, USA.
Nelissen, E. C., van Montfoort, A. P., Dumoulin, J. C. and Evers, J. L. (2011). Epigenetics and the placenta. *Hum. Reprod. Update* **17**, 397-417.
Nomura, Y., Lambertini, L., Rialdi, A., Lee, M., Mystal, E. Y., Grabie, M., Manaster, I., Huynh, N., Finik, J., Davey, M. et al. (2014). Global methylation in the placenta and umbilical cord blood from pregnancies with maternal gestational diabetes, preeclampsia, and obesity. *Reprod. Sci.* **21**, 131-137.
Owens, J. A., Thavaneswaran, P., De Blasio, M. J., McMillen, I. C., Robinson, J. S. and Gatford, K. L. (2007). Sex-specific effects of placental restriction on components of the metabolic syndrome in young adult sheep. *Am. J. Physiol.* **292**, E1879-E1889.
Pembrey, M. (1996). Imprinting and transgenerational modulation of gene expression; human growth as a model. *Acta Genet. Med. Gemellol. (Roma)* **45**, 111-125.
Picone, O., Laigre, P., Fortun-Lamothe, L., Archilla, C., Peynot, N., Ponter, A. A., Berthelot, V., Cordier, A. G., Duranthon, V. and Chavatte-Palmer, P. (2011). Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology* **75**, 287-299.
Ramsey, P. W. and Glenn, L. L. (2002). Obesity and health status in rural, urban, and suburban southern women. *South. Med. J.* **95**, 666-671.
Redmer, D. A., Luther, J. S., Milne, J. S., Aitken, R. P., Johnson, M. L., Borowicz, P. P., Borowicz, M. A., Reynolds, L. P. and Wallace, J. M. (2009). Fetoplacental growth and vascular development in overnourished adolescent sheep at day 50, 90 and 130 of gestation. *Reproduction* **137**, 749-757.
Renfree, M. B., Suzuki, S. and Kaneko-Ishino, T. (2013). The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. *Philos. Trans. R. Soc. B* **368**, 20120151.
Reynolds, L. P., Borowicz, P. P., Vonnahme, K. A., Johnson, M. L., Grazul-Bilska, A. T., Redmer, D. A. and Caton, J. S. (2005). Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J. Physiol.* **565**, 43-58.
Roberts, K. A., Riley, S. C., Reynolds, R. M., Barr, S., Evans, M., Statham, A., Hor, K., Jabbour, H. N., Norman, J. E. and Denison, F. C. (2011). Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. *Placenta* **32**, 247-254.
Roeder, L. M. and Chow, B. F. (1972). Maternal undernutrition and its long-term effects on the offspring. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**, 812-821.
Roseboom, T. J., Painter, R. C., de Rooij, S. R., van Abeelen, A. F., Veenendaal, M. V., Osmond, C. and Barker, D. J. (2011). Effects of famine on placental size and efficiency. *Placenta* **32**, 395-399.
Ruchat, S. M., Hivert, M. F. and Bouchard, L. (2013a). Epigenetic programming of obesity and diabetes by in utero exposure to gestational diabetes mellitus. *Nutr. Rev.* **71 Suppl. 1**, S88-S94.
Ruchat, S. M., Houde, A. A., Voisin, G., St-Pierre, J., Perron, P., Baillargeon, J. P., Gaudet, D., Hivert, M. F., Brisson, D. and Bouchard, L. (2013b). Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics* **8**, 935-943.
Rugg-Gunn, P. J. (2012). Epigenetic features of the mouse trophoblast. *Reprod. Biomed. Online* **25**, 21-30.
Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. and Dean, W. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **241**, 172-182.
Sferruzzi-Perri, A. N., Vaughan, O. R., Haro, M., Cooper, W. N., Musial, B., Charalambous, M., Pestana, D., Ayyar, S., Ferguson-Smith, A. C., Burton, G. J. et al. (2013). An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory. *FASEB J.* **27**, 3928-3937.

Sibley, C. P., Coan, P. M., Ferguson-Smith, A. C., Dean, W., Hughes, J., Smith, P., Reik, W., Burton, G. J., Fowden, A. L. and Constância, M. (2004). Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8204-8208.

Sood, R., Zehnder, J. L., Druzin, M. L. and Brown, P. O. (2006). Gene expression patterns in human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 5478-5483.

Stewart, F. M., Freeman, D. J., Ramsay, J. E., Greer, I. A., Caslake, M. and Ferrell, W. R. (2007). Longitudinal assessment of maternal endothelial function and markers of inflammation and placental function throughout pregnancy in lean and obese mothers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 969-975.

Suter, M. A. and Aagaard, K. (2012). What changes in DNA methylation take place in individuals exposed to maternal smoking in utero? *Epigenomics* **4**, 115-118.

Tanghe, S., Cox, E., Melkebeek, V., De Smet, S. and Millet, S. (2014). Effect of fatty acid composition of the sow diet on the innate and adaptive immunity of the piglets after weaning. *Vet. J.* **200**, 287-293.

Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D., Aubrière, M. C., Peynot, N., Dahirel, M., Bertrand-Michel, J., Aguirre-Lavin, T., Morel, O., Beaujean, N., Duranthon, V. et al. (2013). Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a high fat and control maternal diets in a rabbit model. *PLoS ONE* **8**, e83458.

Thornburg, K. L., O'Tierney, P. F. and Louey, S. (2010). Review: The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. *Placenta* **31 Suppl.**, S54-S59.

Umlauf, D., Goto, Y., Cao, R., Cerqueira, F., Wagschal, A., Zhang, Y. and Feil, R. (2004). Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat. Genet.* **36**, 1296-1300.

van Abeelen, A. F., de Rooij, S. R., Osmond, C., Painter, R. C., Veenendaal, M. V., Bossuyt, P. M., Elias, S. G., Grobbee, D. E., van der Schouw, Y. T., Barker, D. J. et al. (2011). The sex-specific effects of famine on the association between placental size and later hypertension. *Placenta* **32**, 694-698.

Vanhees, K., Vonhögen, I. G., van Schooten, F. J. and Godschalk, R. W. (2014). You are what you eat, and so are your children: the impact of micronutrients on the epigenetic programming of offspring. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 271-285.

Vickers, M. H., Clayton, Z. E., Yap, C. and Sloboda, D. M. (2011). Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function. *Endocrinology* **152**, 1378-1387.

Waddell, J. and McCarthy, M. M. (2012). Sexual differentiation of the brain and ADHD: what is a sex difference in prevalence telling us? *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **9**, 341-360.

Wagschal, A. and Feil, R. (2006). Genomic imprinting in the placenta. *Cytogenet. Genome Res.* **113**, 90-98.

Walker, C. L. and Ho, S. M. (2012). Developmental reprogramming of cancer susceptibility. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 479-486.

Wallace, J. M., Bourke, D. A., Aitken, R. P., Leitch, N. and Hay, W. W., Jr (2002). Blood flows and nutrient uptakes in growth-restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. *Am. J. Physiol.* **282**, R1027-R1036.

Wallace, J. M., Milne, J. S., Matsuzaki, M. and Aitken, R. P. (2008). Serial measurement of uterine blood flow from mid to late gestation in growth restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep dams. *Placenta* **29**, 718-724.

Wallace, J. M., Milne, J. S. and Aitken, R. P. (2010). Effect of weight and adiposity at conception and wide variations in gestational dietary intake on pregnancy outcome and early postnatal performance in young adolescent sheep. *Biol. Reprod.* **82**, 320-330.

Wallace, J. M., Horgan, G. W. and Bhattacharya, S. (2012). Placental weight and efficiency in relation to maternal body mass index and the risk of pregnancy complications in women delivering singleton babies. *Placenta* **33**, 611-618.

Xu, J., Burgoyne, P. S. and Arnold, A. P. (2002). Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1409-1419.

Zambrano, E. and Nathanielsz, P. W. (2013). Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Nutr. Rev.* **71 Suppl. 1**, S42-S54.

Zhu, M. J., Du, M., Nijland, M. J., Nathanielsz, P. W., Hess, B. W., Moss, G. E. and Ford, S. P. (2009). Down-regulation of growth signaling pathways linked to a reduced cotyledonary vascularity in placentomes of over-nourished, obese pregnant ewes. *Placenta* **30**, 405-410.

Zhu, M. J., Du, M., Nathanielsz, P. W. and Ford, S. P. (2010a). Maternal obesity up-regulates inflammatory signaling pathways and enhances cytokine expression in the mid-gestation sheep placenta. *Placenta* **31**, 387-391.

Zhu, M. J., Ma, Y., Long, N. M., Du, M. and Ford, S. P. (2010b). Maternal obesity markedly increases placental fatty acid transporter expression and fetal blood triglycerides at midgestation in the ewe. *Am. J. Physiol.* **299**, R1224-R1231.

Biologie Aujourd'hui, 209 (2), 175-187 (2015)
© Société de Biologie, 2015
DOI: 10.1051/jbio/2015021

Epigénétique et Nutrition : impacts de l'alimentation maternelle sur le développement placentaire et la santé de la descendance

Polina E. Panchenko[1,2], Marion Lemaire[1], Sara Fneich[1], Sarah Voisin[1,2], Mélanie Jouin[1], Claudine Junien[1] et Anne Gabory[1]

[1] INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, 78350 Jouy-en-Josas, France
[2] Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 75005 Paris, France

Auteur correspondant : Anne Gabory, anne.gabory@jouy.inra.fr

Reçu le 21 juillet 2015

Résumé – L'environnement au cours du développement précoce de l'individu conditionne le phénotype à long terme, en particulier la susceptibilité, ou non, à développer des maladies non transmissibles. Cette notion des Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD pour *Developmental Origins of Health and Disease*) s'appuie sur de nombreuses études épidémiologiques ainsi que sur des modèles animaux. Ainsi la nutrition riche et l'obésité parentale peuvent prédisposer l'enfant à développer lui-même des pathologies métaboliques et cardiovasculaires à l'âge adulte. Les mécanismes sous-jacents incluent une dysfonction placentaire qui va impacter la croissance et le développement du fœtus. Les mécanismes épigénétiques, qui modulent l'expression des gènes et permettent d'établir une identité cellulaire, sont sensibles à des facteurs de l'environnement, tels que la nutrition et le métabolisme énergétique. Les marques épigénétiques peuvent donc permettre la mémorisation de l'environnement précoce et induire à long terme une altération de la fonction des organes, conditionnant ainsi la susceptibilité à la pathologie. Nous avons montré que le placenta est sensible à l'alimentation et au statut métabolique maternels d'un point de vue histologique, transcriptionnel et épigénétique. Par ailleurs, un dimorphisme sexuel est très marqué dans la réponse placentaire à l'environnement maternel. Des mécanismes épigénétiques pourraient être à la base de cette réactivité différentielle entre femelle et mâle. La notion de DOHaD ne peut plus être ignorée en Biologie de la Reproduction aujourd'hui. La prévention doit tenir compte de ce nouveau paradigme. La recherche est encore nécessaire pour bien comprendre les mécanismes de ce conditionnement précoce et le dimorphisme sexuel marqué de ce phénotype.

Mots clés : Origines Développementales de la Santé et des Maladies (DOHaD) / nutrition / épigénétique / biologie du développement / placenta

Abstract – Epigenetics and Nutrition: maternal nutrition impacts on placental development and health of offspring.

The environment, defined broadly by all that is external to the individual, conditions the phenotype during development, particularly the susceptibility to develop non-communicable diseases. This notion, called Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), is based on numerous epidemiological studies as well as animal models. Thus, parental nutrition and obesity can predispose the offspring to develop metabolic and cardiovascular diseases in adulthood. The known underlying mechanisms include an altered development of tissues that adapt to maternal metabolic condition, and a placental dysfunction, which in turn impacts fetal growth and development. Epigenetic mechanisms modulate gene expression without affecting the DNA sequence itself. The main epigenetic marks are DNA methylation and histone post-translational modifications. These marks are erased and set-up during gametogenesis

Article publié par EDP Sciences

and development in order to ensure cellular identity. Therefore, they can lead to a memorisation of early environment and induce long-term alteration of cell and tissue functions, which will condition the susceptibility to non-communicable diseases. The placenta is a programming agent of adult disease. The environment, such as smoking or psychosocial stress, is able to modify epigenetic processes in placenta, such as small RNA expression and DNA methylation. We showed that placenta is sensitive to maternal obesity and maternal nutrition, in terms of histology, transcription and epigenetic marks. A clear sexual dimorphism is remarkable in the placental response to maternal environment. In adulthood, the phenotype is also different between males and females. Epigenetic mechanisms could underlie this differential response of males and females to the same environment. The DOHaD can no longer be ignored in Biology of Reproduction. The prevention of non-communicable diseases must take this new paradigm into account. Research will allow a better comprehension of the mechanisms of this early conditioning and the marked sexual dimorphism it is associated to.

Key words: Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) / nutrition / epigenetics / developmental biology / placenta

Introduction

Une particularité de la reproduction chez les mammifères est la vie *in utero*. La relation intime entre la mère et l'embryon puis le fœtus se fait par le contact de l'endomètre et d'un organe transitoire dédié à cette fonction : le placenta. Il assure entre autres le transfert des nutriments et de l'oxygène de la mère vers le fœtus, l'excrétion des déchets du fœtus vers la mère et contribue ainsi à la croissance fœtale. Depuis environ 25 ans, ce dernier paramètre est particulièrement étudié. Il a été montré que la croissance fœtale est étroitement liée au risque de développer des pathologies chroniques à l'âge adulte, telles que les pathologies métaboliques, cardiovasculaires, certains cancers, maladies respiratoires chroniques, *etc.*... L'alimentation des parents pendant la période préconceptionnelle, l'alimentation maternelle au cours du développement et pendant la période de lactation sont des facteurs qui peuvent influencer l'individu en développement et affecter le fonctionnement des organes à long terme. Les mécanismes épigénétiques, indissociables des principes d'identité cellulaire et de mémoire de ces identités au cours du développement et tout au long de la vie, sont des acteurs clés de cette notion de conditionnement précoce aux pathologies d'apparition tardive. Les nutriments et leurs métabolites peuvent influencer le fonctionnement des enzymes qui régulent l'apposition et l'effaçage des marques épigénétiques, ce qui pourrait être un lien entre les habitudes alimentaires et le métabolisme des parents et l'expression génique du fœtus puis de l'individu. Ce concept des origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte est donc une nouvelle donnée à prendre en compte en Biologie de la Reproduction aujourd'hui.

1 Les origines développementales de la santé et des maladies : une question de santé publique encore mal connue

1.1 La notion de DOHaD (*Developmental Origins of Health and Disease*)

Les maladies non transmissibles (MNT), principalement maladies cardio-vasculaires, diabète, cancers et affections respiratoires chroniques, sont responsables de 63 % des décès à l'échelle mondiale (Organisation Mondiale de la Santé, 2010). L'un des plus importants facteurs de risque pour ces maladies est le surpoids et l'obésité. Ces pathologies apparaissent lorsque la balance énergétique est rompue : excès d'apport calorique due à une alimentation trop riche, et faible dépense énergétique, causée par la sédentarité et un métabolisme de base réduit. Il apparaît aujourd'hui que l'environnement d'un individu au temps t ne suffit pas à expliquer ce déséquilibre de la balance énergétique (Hanson & Gluckman, 2014). L'hypothèse des DOHaD s'est développée à partir de la notion de « programmation fœtale », initialement proposée par Barker dans les années 90 (Barker, 1990). Ce concept postule que l'environnement dans lequel se trouve l'individu au cours de son développement précoce (périodes préconceptionnelle, *in utero* et postnatale précoce), peut avoir des conséquences importantes pour sa santé au cours de sa vie adulte, conduisant aux MNT (Junien *et al.*, 2005).

Une des premières études épidémiologiques dans le domaine, dans les années 1970, a permis de proposer l'hypothèse selon laquelle des conditions de vie précaires au cours de l'enfance et de l'adolescence,

suivies par une surabondance alimentaire à l'âge adulte, contribueraient au développement des maladies cardio-vasculaires (Forsdahl, 1977). Un lien entre restriction nutritionnelle périnatale et conséquences à long terme sur la descendance a également été démontré chez des modèles de rongeurs. Plus particulièrement, le poids corporel, la fonction rénale, l'activité locomotrice, le comportement émotionnel et l'apprentissage sont affectés par la sous-nutrition maternelle (Roeder & Chow, 1972). Les travaux réalisés par la suite par Barker et ses collaborateurs dans les années 1980 sur des cohortes britanniques ont permis de mettre en évidence une corrélation entre poids de naissance, pression artérielle et risque de mort à cause d'une maladie cardiovasculaire. Ainsi, un retard de croissance intra-utérin est associé à une plus grande susceptibilité de développer des maladies chroniques du système cardiovasculaire à l'âge adulte (Barker *et al.*, 1989, 2010a). À l'heure actuelle, un grand nombre d'études épidémiologiques chez l'Homme et d'études de modèles animaux a montré qu'aussi bien la sous-nutrition que la surnutrition, les pollutions, le stress psychosocial, *etc.*... chez la mère mais aussi chez le père, sont des éléments qui conditionnent la santé de l'individu en devenir et sa prédisposition à développer des pathologies non transmissibles.

1.2 DOHaD et santé publique : l'importance de la prévention

La plupart des politiques actuelles se concentrent sur la diminution des facteurs de risques à l'âge adulte et sur le traitement de la maladie après son diagnostic. Ces soins coûtent chers : à titre d'exemple, en France, le remboursement aux personnes diabétiques traitées pharmacologiquement a été estimé à 12,5 milliards d'euros en 2007. Le poste de dépense le plus important est l'hôpital (37 %) suivi des médicaments (27 %) (Haute Autorité de Santé, 2013). D'après les études internationales quantifiant le poids économique de la morbidité et de la mortalité liées à l'obésité, l'estimation minimale de ces coûts serait de 2 à 7 % des coûts de santé (Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé, 2005).

L'hypothèse de la DOHaD présente aujourd'hui une nouvelle explication possible pour l'explosion de maladies chroniques observée et offre de nouveaux moyens d'action pour les prévenir. Plutôt que d'agir sur des adultes souvent déjà atteints, la politique de prévention devrait avoir pour objectif de réduire le développement de l'obésité chez les femmes et les hommes avant qu'ils ne soient en âge de procréer, en contrôlant notamment leur poids corporel préconceptionnel (Poston *et al.*, 2011). Il semblerait qu'en investissant tôt, les bénéfices se trouvent accrus et puissent être appréciés sur une plus longue période ; le retour sur investissement serait donc plus élevé. Pour qu'un programme de prévention soit réellement efficace, il devrait ainsi débuter avant même la naissance puisque l'environnement intra-utérin et le comportement maternel au cours de la grossesse ont des conséquences à long terme sur le développement et la santé de la descendance (Doyle *et al.*, 2009).

Cependant, la notion de DOHaD reste méconnue par le grand public et les autorités de santé. Pour permettre la prise de conscience et l'éducation de la population, les actions à moyen et long terme doivent donc principalement s'appuyer sur l'information de la population générale. Une éducation à la pratique d'une nutrition saine et plus généralement d'un mode de vie sain doit en particulier cibler les personnes en âge de procréer et les enfants en milieu scolaire avec de nouveaux outils pédagogiques.

Pour conclure, « *le modèle scientifique et de santé publique actuellement dominant pour les MNT suppose qu'elles sont la conséquence d'une prédisposition génétique et d'un choix volontaire de mode de vie. Cependant, les tentatives pour réduire le poids des MNT en favorisant la perte de poids et le changement des habitudes de vie des adultes ont eu relativement peu de succès en termes de santé publique. Au-delà des questions de politiques culturelles, comportementales et publiques, il existe des raisons physiologiques à cette difficulté du maintien de la perte de poids. Par exemple, les réseaux neuroendocrines de régulation de l'appétit qui favorisent la faim et l'apport alimentaire persistent après une perte de poids forcée. Les tentatives visant à promouvoir un environnement moins obésogène ne doivent pas être découragés, mais il n'est pas logique d'ignorer l'importance des processus physiologiques sous-jacents* » (Hanson & Gluckman, 2014). Aussi, il est important de développer des modèles d'études pertinents afin de décrypter ces mécanismes qui ne peuvent plus être ignorés en Biologie de la Reproduction aujourd'hui. L'étude des modèles de rongeurs, largement développés, mais aussi d'autres modèles animaux comme le mouton, le lapin ou les primates non humains est donc à promouvoir.

2 Mécanismes à la base du concept de DOHaD

Divers mécanismes ont été évoqués pour expliquer comment l'individu peut être conditionné *in utero* par l'alimentation maternelle (Warner & Ozanne, 2010 ; Williams *et al.*, 2014). Les revues de la littérature montrent que la programmation du syndrome métabolique par les facteurs environnementaux maternels passe par une altération de plusieurs systèmes biologiques chez la descendance (figure 1).

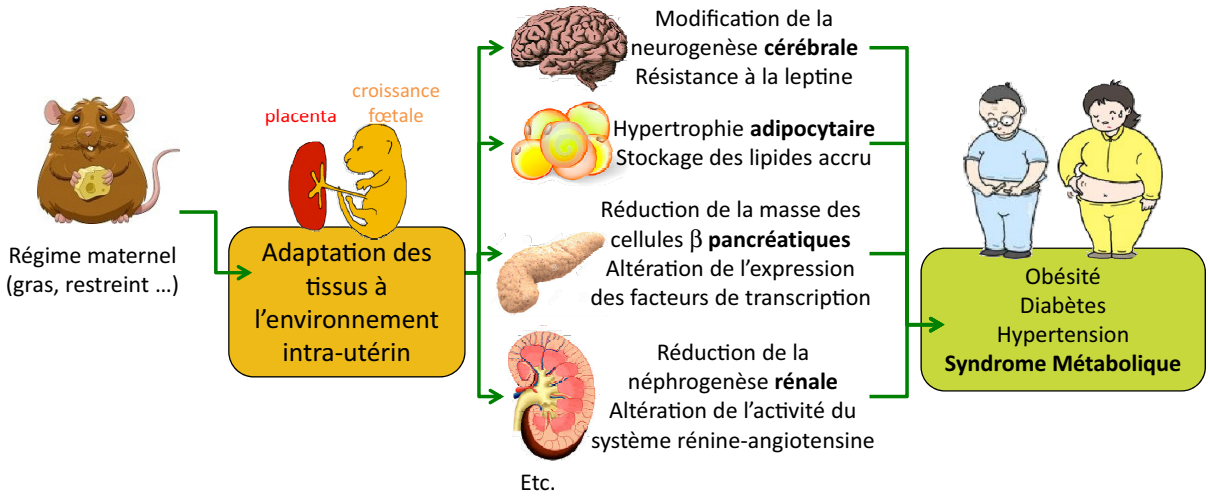


Fig. 1. Mécanismes de DOHaD par l'alimentation maternelle. L'alimentation maternelle peut entraîner une adaptation des tissus de l'individu. La courbe de croissance fœtale, liée au développement et à la fonction placentaire, est un élément marqueur de la prédisposition. L'alimentation peut également modifier la structure des tissus, par exemple la répartition des types neuronaux dans le cerveau, une augmentation du nombre d'adipocytes, une réduction du nombre de cellules β-pancréatiques ou de néphrons. Cela peut également altérer finement le fonctionnement des tissus, entraînant une résistance à la leptine, une capacité de stockage adipocytaire accrue, une altération du fonctionnement pancréatique, de l'activité rénine-angiotensine. L'ensemble prédispose à l'hyperphagie, le stockage des lipides, la résistance au glucose et à l'insuline, une altération du système cardiovasculaire et donc à l'obésité, au diabète et à l'hypertension, trois composantes du syndrome métabolique. D'après Warner & Ozanne (2010) et Williams *et al.* (2014).

La croissance fœtale, intimement liée au fonctionnement du placenta, est un autre élément très important qui sera développé dans le point 2-1. Les mécanismes épigénétiques, qui régulent l'expression des gènes sans changer la séquence d'ADN, sont impliqués dans la DOHaD selon de nombreuses études. Ce sujet sera explicité dans le point 2-2.

2.1 Développement placentaire et croissance fœtale

De nombreuses fonctions du placenta sont vitales pour le développement du fœtus, assurant sa croissance, la respiration, l'excrétion des déchets métaboliques et la protection immunitaire. Le placenta fournit les nutriments provenant de la circulation maternelle. Il est capable de stocker les lipides et l'énergie sous forme de glycogène et les lipides. Les ions, l'eau, et les macromolécules (acides aminés, glucose, acides gras ...) sont transportés de façon sélective à travers la barrière placentaire. La grossesse est maintenue en partie grâce aux hormones produites par le trophoblaste. Le placenta a une capacité considérable d'adaptation métabolique mais s'il atteint ses limites de plasticité, le fœtus peut être exposé à l'environnement maternel néfaste, avec des conséquences sur sa prédisposition aux maladies à long terme (Godfrey, 2002).

Un petit, ou au contraire, un grand poids placentaire sont des marqueurs de prédisposition aux maladies cardio-vasculaires et au diabète de type 2 (Godfrey, 2002 ; Thornburg *et al.*, 2010). Le risque d'insuffisance cardiaque chronique à l'âge adulte est également associé avec une surface placentaire plus petite (Barker *et al.*, 2010b). Le métabolisme maternel peut agir à différents niveaux sur la fonction placentaire. Ainsi, en cas d'obésité ou de diabète maternel, l'altération des paramètres sanguins associée à ces conditions affecte l'histologie, la vascularisation et les transferts des nutriments placentaires et induit, en fonction du trouble métabolique, une inflammation locale ou une hypoxie (Gabory *et al.*, in press ; Tarrade *et al.*, 2015). Le tableau 1 fait un état des lieux non exhaustif d'études sur l'obésité et la surnutrition maternelle concernant le développement placentaire. L'obésité paternelle est également un facteur de risque : chez la souris, les embryons issus de mâles obèses présentent une restriction de croissance fœtale associée avec un placenta significativement plus petit que celui des témoins. L'efficacité placentaire n'est pas modifiée (Binder *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces données atteste l'influence de l'obésité parentale sur la morphologie et le fonctionnement du placenta. Des altérations de la fonction nutritive du placenta mènent à une modification de l'apport des nutriments, et impactent ainsi la croissance

Tableau 1. Effets de l'obésité et la surnutrition maternelle sur le développement placentaire.

Espèce	**Environnement maternel**	**Phénotype placentaire**	**Epigénétique**	**Références**
Souris	Régime hyperlipidique	↑ transport des acides aminés et du glucose	–	(Jones *et al.*, 2009)
Souris	Régimehyperlipidique	↑ poids	Hypométhylation de l'ADN (F) Hypométhylation de l'ADN ↓ *Dnmt3l, Suv39h1, Suv39h2, Prmt7*,≠ H3K9me3 (F) ; DS (*Kdm5c*, *Kdm5d*)	(Gabory *et al.*, 2012 ; Gallou-Kabani *et al.*, 2010)
Souris	Régime hyperlipidique	transcriptome altéré (DS)	–	(Mao *et al.*, 2010)
Souris	Régime hyperlipidique	↑ stress oxydatif, ↓ nombre de cellules trophoblastiques ; nécrose de l'endothélium des vaisseaux fœtaux dans le labyrinthe	–	(Liang *et al.*, 2010)
Souris	Régime hyperlipidique	↑ *Gr, slc38a2, Igf2, Igf2r* (M) à E14.5, rétablissement à E18.5	–	(King *et al.*, 2013)
Souris	Régime hyperlipidique	↓ épaisseur du labyrinthe, ↓ prolifération cellulaire, ↑ expression des cytokines inflammatoires	–	(Kim *et al.*, 2014)
Rat	Obésité	↑ poids ; ↓ expression des gènes de la biogenèse mitochondriale dans le labyrinthe (M)	–	(Borengasser *et al.*, 2014)
Lapin	Régimehyperlipidique	↑ lipides (DS)	–	(Tarrade *et al.*, 2013)
Macaque	Régime hyperlipidique	hémodynamique placentaire altérée, inflammation ; risque de mort du fœtus	–	(Frias *et al.*, 2011)
Homme	Obésité	↑ poids ; infiltration par les macrophages, ↑ des cytokines	–	(Challier *et al.*, 2008)

Tableau 1. Suite.

Espèce	Environnement maternel	Phénotype placentaire	Epigénétique	Références
Homme	Obésité	↑ poids ; transport lipidique altéré	–	(Dubé *et al.*, 2012)
Homme	Diabète gestationnel	–	Hyperméthylation de la leptine, hypométhylation de IGFR, IGFBP3, MEST	(Hajj *et al.*, 2013 ; Lesseur *et al.*, 2014 ; Ruchat *et al.*, 2013b)
Homme	Obésité /diabète gestationnel	–	Hypométhylation (diabète), hyperméthylation de l'ADN (obésité)	(Nomura *et al.*, 2014)
Homme	Obésité	↓ activité de la chaîne respiratoire, biogenèse des mitochondries, production de l'ATP	–	(Hastie & Lappas, 2014)
Homme	Obésité	insuffisance placentaire, thromboses vasculaires, microinfarctus des villosités, infiltration par des cellules immunitaires	–	(Huang *et al.*, 2014)
Homme	Obésité	↑ stress oxydatif, ↓ production de l'ATP, biogenèse des mitochondries, complexes de la chaine respiratoire	–	(Mele *et al.*, 2014)
Homme	Obésité	↑ lipides ; expression de 288 gènes est altérée (angiogenèse, métabolisme lipidique, signalisation cellulaire des hormones, inflammation)	–	(Saben *et al.*, 2014)
Homme	Diabètegestationnel	–	Méthylome : associé avec l'endocytose, la voie MAPK	(Finer *et al.*, 2015)
Homme	Activité physique /composition alimentaire	↑ transport des acides aminés, ↓ transport des acides gras (activité physique) ; association de consommation des sucres avec *GLUT1*	–	(Brett *et al.*, 2015)

et la composition corporelle du fœtus chez l'Homme et chez la souris (Myatt, 2006).

2.2 Mécanismes épigénétiques et environnement

Les marques épigénétiques sont héritables au cours des divisions cellulaires et sensibles à l'environnement (Gabory *et al.*, 2011). À l'heure actuelle, les trois mécanismes principaux décrits sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARN non codants. Les marques sont apposées et retirées par un grand nombre d'enzymes, et lues par des protéines de liaison à la chromatine, l'ensemble constituant la machinerie épigénétique. L'épigénome est l'ensemble des marques épigénétiques. Les marques épigénétiques contrôlent le niveau de condensation de la chromatine et l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription, donc l'expression génique. L'expression d'un gène est associée avec des marques activatrices, représentant des régions de la chromatine « ouvertes » et accessibles pour la machinerie transcriptionnelle. En revanche, les gènes transcriptionnellements inactifs sont associés avec des marques répressives, représentant des régions « verrouillées » et inaccessibles aux facteurs de transcription (Kouzarides, 2007).

Les mécanismes épigénétiques et le métabolisme énergétique/nutrition sont interconnectés. En effet, la S-adénosyl méthionine (SAM) et l'acétyl-Coenzyme A, deux acteurs du métabolisme énergétique, sont respectivement donneur de groupement CH3 (méthyle) pour la méthylation de l'ADN et des histones, et donneur de groupement de -COCH3 (acétyle) pour la réaction d'acétylation des histones. La SAM fait partie du métabolisme monocarboné impliquant le cycle de l'acide folique (vitamine B9), mais aussi les vitamines B2, B6 et B12, la méthionine, la bétaïne, la choline ou le zinc (Anderson *et al.*, 2012). L'acétylCoA, pivot métabolique, peut être obtenu entre autres par les métabolismes du glucose, des acides gras et des acides aminés. Les nutriments et leurs métabolites peuvent également être des activateurs ou des inhibiteurs directs des enzymes de la machinerie épigénétique, comme par exemple le sulforafane du brocoli, les polyphénols du thé vert ou la génistéine du soja (Delage & Dashwood, 2008 ; Li *et al.*, 2013). Enfin, les nutriments et leurs métabolites peuvent être des substrats pour les récepteurs membranaires ou nucléaires, ce qui conduit à une modification locale de la chromatine sur les séquences des gènes cibles de ces différentes voies de signalisation cellulaire (Gabory *et al.*, 2011).

Au cours du développement, les marques épigénétiques subissent un remodelage important, qui va définir l'identité cellulaire (figures 2A, 2B). Il existe deux phases de « remise à zéro », ou de « reprogrammation » épigénétique, au cours desquelles l'épigénome est effacé puis réapposé de façon spécifique. Ainsi la méthylation de l'ADN ainsi que les modifications d'histones sont hautement dynamiques au cours du développement embryonnaire (Beaujean, 2014 ; Beaujean *et al.*, 2010), ce qui fait de cette période une fenêtre critique pour l'exposition à l'environnement.

Les processus épigénétiques sont donc de bons candidats pour la « mémorisation » par le génome des événements environnementaux passés. Une variation des apports nutritionnels et de la constitution corporelle du père ou de la mère pendant les périodes clés de la gamétogénèse et du développement peut entraîner des modifications de l'effaçage ou de la mise en place des marques épigénétiques (figure 2C). Cela entraînerait des modifications de l'expression de gènes clés du développement et pourrait par conséquent affecter l'organogenèse et le fonctionnement des organes ou modifier de façon plus subtile la régulation de l'expression de gènes importants pour le fonctionnement du tissu. Ainsi, plus tard, cette mémorisation contribuera à un phénotype sensible à un environnement délétère, pouvant évoluer vers la pathologie (Junien *et al.*, 2005 ; Attig *et al.*, 2010 ; Gabory *et al.*, 2011).

3 Impacts de l'alimentation maternelle riche en lipides sur le développement placentaire : dimorphisme sexuel et épigénétique

L'intérêt de travailler sur le placenta est multiple, il est à la fois :

(1) un modèle pour l'étude de l'atteinte du développement d'un organe par une alimentation maternelle inappropriée ;
(2) un témoin des impacts de l'environnement précoce pendant la gestation ;
(3) un organe qui conditionne le développement des pathologies métaboliques, comme nous l'avons évoqué dans la partie 2-1 ;
(4) un organe facilement accessible et disponible après la naissance, permettant d'éviter chez l'humain des tests invasifs pour la mère et son enfant. Des biomarqueurs de perturbations précoces et de prédispositions aux MNT à l'âge adulte pourraient donc être développés.

L'impact de l'exposition à des substances toxiques (tabagisme actif ou passif, métaux toxiques, perturbateurs endocriniens, *etc.*) ou au stress maternel sur la méthylation de l'ADN (gènes candidats ou ensemble du méthylome) ainsi que sur l'expression de microARN est largement reconnu et répertorié (Maccani *et al.*, 2010 ; Bale, 2011 ; Lee & Ding, 2012 ; Monk

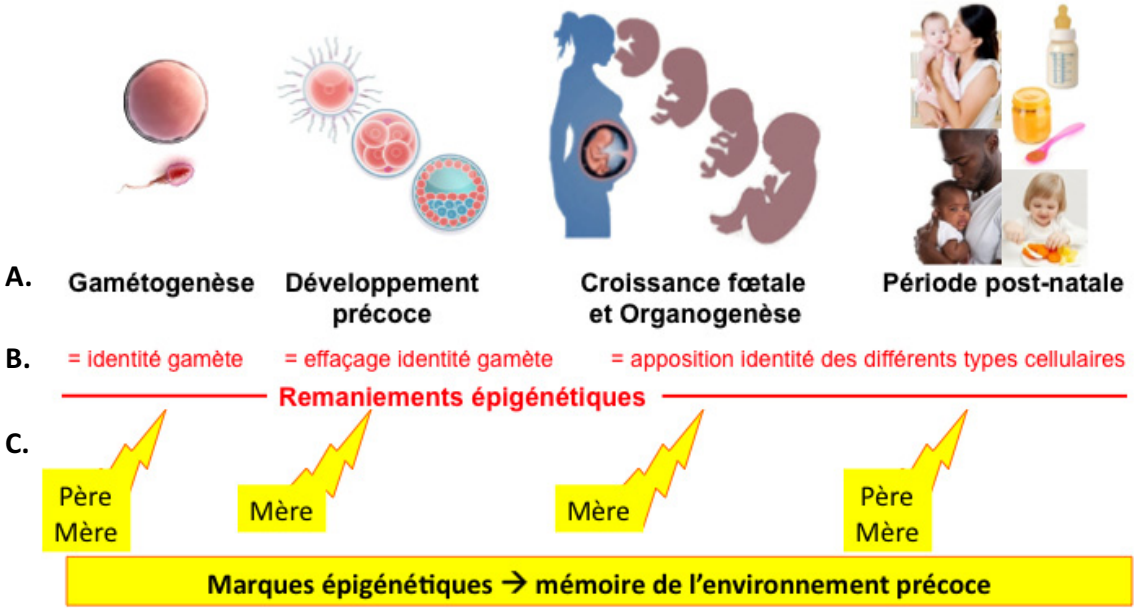


Fig. 2. Biologie du développement, épigénétique et DOHaD. **A.** Le développement peut être découpé en quatre fenêtres critiques : la gamétogenèse, le développement préimplantatoire précoce où se mettent en place les premiers lignages embryonnaires et extra-embryonnaires, la phase d'organogenèse et de croissance fœtale et la période postnatale où l'environnement change brusquement, où les soins parentaux sont cruciaux et où se font les transitions alimentaires. **B.** Au cours de la gamétogenèse, les marques épigénétiques sont effacées dans les cellules germinales primordiales, puis un épigénome spécifique des gamètes est apposé. L'identité gamétique doit être effacée au cours du développement précoce. Dans la masse cellulaire interne du blastocyste, qui donnera l'embryon proprement dit, l'épigénome permet la totipotence. Au cours de la différenciation cellulaire, pendant les phases d'organogenèse et de croissance fœtale et post-natale, un épigénome spécifique de chaque type cellulaire est apposé, permettant le patron d'expression et le fonctionnement spécialisé de chaque cellule. **C.** L'environnement paternel et/ou maternel, en fonction de la fenêtre impliquée, peut affecter l'effaçage ou l'apposition de l'épigénome, peut influencer la mise en place des marques spécifiques à chaque type cellulaire. Cela peut modifier le profil d'expression à long terme et influencer le développement de pathologies.

et al., 2012; Suter & Aagaard, 2012; Marsit, 2015). Une synthèse récente rapporte également les effets de l'exposition à la surnutrition et l'obésité maternelle sur le placenta (Gabory *et al.*, in press). Nous allons donc dans ce chapitre nous concentrer sur les travaux de notre laboratoire ainsi que sur un nombre limité de publications dans le domaine de l'épigénétique placentaire.

3.1 Travaux de notre laboratoire

Dans un modèle de lapin, des femelles ont été nourries avec un régime hypergras (HG) pendant la puberté, en période préconceptionnelle et pendant la gestation (Picone *et al.*, 2011). L'alimentation maternelle HG affecte le trophoblaste (accumulation de lipides dans le cytoplasme) et également l'expression génique au stade blastocyste. En fin de gestation, les fœtus HG présentent une restriction de croissance. De façon intéressante, des changements spécifiques du sexe ont été observés dans le placenta en termes d'expression génique mais aussi d'adaptation physiologique. Tous les fœtus présentent un accroissement du stockage placentaire et hépatique des acides gras, ainsi qu'une augmentation des taux de lipides sanguins. Mais les fœtus femelles présentent un stockage placentaire des lipides plus important que les fœtus mâles tandis que les fœtus mâles présentent une dyslipidémie plus prononcée (Tarrade *et al.*, 2013). Ces données démontrent que l'alimentation maternelle HG affecte le blastocyste et induit des adaptations métaboliques dépendantes du sexe dans le placenta, ce qui semble protéger les fœtus femelles du développement d'une dyslipidémie sévère.

Nous avons développé un modèle murin pour étudier les effets de l'alimentation maternelle uniquement pendant la gestation. Les femelles ont été nourries avec un régime HG à partir du croisement et jusqu'au milieu du 3ème tiers de gestation (jour E15,5), où fœtus et placentas ont été collectés. Le poids fœtal n'est pas affecté par le régime maternel HG. En revanche, le poids placentaire est augmenté et l'efficacité placentaire est réduite (Gallou-Kabani *et al.*, 2010). Les placentas ne présentent aucune

modification de la structure de la zone labyrinthique ou jonctionnelle (Gabory *et al.*, 2012). De manière intéressante, le poids du placenta et l'efficacité placentaire diffèrent selon le sexe du conceptus (Gallou-Kabani *et al.*, 2010). Nous avons ensuite montré que le transcriptome placentaire présente un dimorphisme sexuel quel que soit le régime alimentaire maternel. L'évidence de ce dimorphisme nous a conduits à étudier l'effet du régime maternel HG chez les femelles et les mâles séparément. La réponse transcriptionnelle au même régime maternel est différente pour des mâles et des femelles en développement dans le même utérus. Ces différences sont non seulement quantitatives mais aussi qualitatives : les fonctions et les réseaux de gènes impliqués dans la réponse au régime maternel diffèrent nettement entre les sexes. Chez les femelles, il s'agit principalement de signalisation cellulaire, impliquant des cellules immunitaires et le transport et le métabolisme des acides aminés, alors que chez le mâle sont impliqués le développement et la fonction du système vasculaire, et le transport et le métabolisme du glucose, des acides gras (Gabory *et al.*, 2012).

Nous avons ensuite voulu savoir si les mécanismes épigénétiques pouvaient être impliqués dans la réponse au régime maternel HG. Dans les placentas des fœtus femelles, une hypométhylation globale de l'ADN est observée. Chez les mâles, la différence n'est pas statistiquement significative (Gallou-Kabani *et al.*, 2010). De façon intéressante, l'expression de *Dnmt3l*, un cofacteur d'ADN méthyltransférases, est plus faible dans les placentas femelles de mère HG, ce qui pourrait contribuer à la diminution du niveau de la méthylation globale de l'ADN, observée dans cette étude. L'expression des lysines méthyltransférases *Kmt1a* et *Kmt1b* (*Suv39h1* et *Suv39h2*) est également réduite sous régime HG. Aucune altération du niveau total de leur marque cible, H3K9me3, n'a été observée. Toutefois, la mise en place de cette marque est régulée par un grand nombre d'enzymes. Des différences sur des cibles spécifiques au niveau du génome pourraient exister en réponse au régime maternel HG sans que cela affecte la mesure du niveau global de façon significative. Le niveau d'expression de l'arginine méthyltransférase *Prmt7* est également diminué, mais son rôle dans le placenta est inconnu (Gabory *et al.*, 2012). La dérégulation de l'expression des gènes de la machinerie épigénétique pourrait ainsi être à l'origine d'altérations du transcriptome placentaire. Des études plus approfondies seraient nécessaires afin de démontrer un lien causal entre la sensibilité de la machinerie épigénétique à l'obésité maternelle, l'épigénome et l'expression génique dans le placenta.

Enfin, nous avons observé que l'expression des gènes *Kdm5c* et *Kdm5d* (*Jarid1c* et *Jarid1d*), qui codent les déméthylases de la marque H3K4me3, est différente entre sexes (Gabory *et al.*, 2012). Ces gènes paralogues sont sur les chromosomes X et Y : *Kdm5c* est sur le chromosome X et échappe à l'inactivation du chromosome X (Li & Carrel, 2008) ; *Kdm5d* est sur l'Y et donc seulement exprimé dans les placentas de mâles. Nous avons en effet constaté que *Kdm5c* est plus exprimé dans les placentas femelles que mâles, indépendamment du régime alimentaire de la mère. En utilisant des amorces reconnaissant à la fois les transcrits *Kdm5c* et *5d*, nous avons constaté par RT-qPCR que l'expression du gène *Kdm5d* chez les mâles n'est pas en mesure de compenser l'expression de *Kdm5c*, l'expression restant plus élevée chez les femelles que chez les mâles (Gabory *et al.*, 2013). Le fait que ces deux protéines aient la même fonction ou pourraient être associées à différents partenaires, en ciblant par conséquent des régions différentes du génome, n'est pas clair (Xu *et al.*, 2002). Ces enzymes épigénétiques pourraient donc marquer l'épigénome d'une manière spécifique du sexe, aussi bien au niveau quantitatif que qualitatif.

3.2 Discussion

D'autres études dans la littérature ont montré un lien entre nutrition riche, altération du métabolisme en cas d'obésité et/ou diabète maternel et épigénome placentaire. Ces études ont été conduites sur des cohortes humaines et s'intéressent exclusivement à la méthylation de l'ADN. Ainsi une hypométhylation globale de l'ADN est observée en cas de diabète gestationnel et une légère hyperméthylation en cas d'obésité maternelle (Nomura *et al.*, 2014). La méthylation de l'ADN au niveau du promoteur des gènes *LEPTINE*, *ADIPONECTINE* et *ABCA1* dans le placenta à la naissance semble corrélée à la glycémie maternelle au cours du test de charge au glucose réalisé pendant la grossesse, sans être toutefois significativement liée au diabète gestationnel (Ruchat *et al.*, 2013a). Une autre étude montre un lien significatif entre diabète gestationnel et hyperméthylation du promoteur de *LEPTINE* (Lesseur *et al.*, 2014). Les promoteurs des gènes *IGF1R, IGFBP3* et *MEST* sont en revanche hypométhylés en cas de diabète gestationnel (Hajj *et al.*, 2013 ; Ruchat *et al.*, 2013a). De façon plus marquante, le méthylome placentaire a aussi été étudié en cas de diabète maternel. Les gènes associés aux régions différentiellement méthylées sont principalement associés aux pathologies cardiovasculaires et métaboliques, selon les études bioinformatiques (Ruchat *et al.*, 2013b). Une autre étude a trouvé une association avec l'endocytose, la voie MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), suggérant une association entre méthylation différentielle en cas de diabète gestationnel et les processus d'autophagie (Finer *et al.*, 2015). Cela implique que le métabolisme

maternel peut affecter la méthylation de l'ADN dans son ensemble mais également affecter certains gènes de façon spécifique. Les faibles différences observées dans toutes ces études sont discutables. Elles reflètent plus ou moins le pourcentage de cellules pour lequel la méthylation varie dans le tissu et donc le pourcentage de cellules pour lequel le profil d'expression et la fonction peuvent être affectés. Une différence de 3 à 7 % est-elle significative biologiquement parlant ? Cela dépend de la localisation de ces cellules : sont-elles réparties dans l'ensemble du tissu ou concernent-elles un sous-ensemble spécialisé de cellules ? Dans l'état actuel des connaissances, la réponse à ces questions n'est pas possible et nous ne pouvons donc que spéculer un effet de ces différences de méthylation de l'ADN.

Le dimorphisme sexuel du fonctionnement placentaire est reconnu aussi bien chez l'Homme que l'animal. Quarante-et-un gènes sont différentiellement exprimés selon le sexe dans le transcriptome placentaire humain : 34 sont plus fortement exprimés dans les placentas de fille et 7 dans les placentas de garçon. Un quart d'entre eux sont localisés sur les chromosomes sexuels (Sood *et al.*, 2006). Une réactivité du placenta à l'environnement maternel différente selon le sexe a également été décrite (Clifton, 2010 ; Gabory *et al.*, 2013 ; Tarrade *et al.*, 2015). Chez la souris, trois régimes différents ont été testés au cours du développement et le transcriptome est spécifique du sexe pour chacun de ces régimes (Mao *et al.*, 2010). Dans un modèle de babouin en restriction calorique au cours de la gestation, le placenta des femelles montre une réponse transcriptionnelle importante, alors que dans les placentas mâles, la réponses est limitée (Cox *et al.*, 2013). Dans un modèle murin d'obésité paternelle, l'expression de 24 gènes a été mesurée. Quatre gènes présentent une répression transcriptionnelle en cas d'obésité paternelle chez le mâle : *Ppara, Tnf, Mmp2 et Casp12*. Chez la femelle, aucun gène n'est différentiellement exprimé. La méthylation globale de l'ADN n'est pas modifiée lorsque le sexe n'est pas pris en compte. En tenant compte du sexe, une hyperméthylation est observée dans les placentas femelles uniquement (Binder *et al.*, 2015).

Dans la majorité des études, la réponse placentaire est plus importante chez la femelle que chez le mâle, ce qui n'était pas le cas dans nos données (Gabory *et al.*, 2012). L'hypothèse est que la stratégie d'adaptation de la croissance fœtale serait différente entre sexes : la plus grande réactivité des placentas femelles permettrait de tamponner les effets de l'environnement et donc une meilleure adaptation des fœtus femelles (Clifton, 2010). Cela « protégerait » les femelles et limiterait ainsi les effets à long terme, comme cela semble être le cas pour le modèle lapin (Tarrade *et al.*, 2013). Les descendants mâles seraient alors plus touchés par les pathologies à l'âge adulte. Ces différences observées dans le conditionnement des MNT (Bale, 2011 ; Aiken & Ozanne, 2013) pourraient donc trouver leur origine *in utero*. Nos observations de l'expression différentielle des enzymes de la machinerie épigénétique *Kdm5c* et *5d* entre mâles et femelles apportent également de nouveaux éléments. D'autres études montrent l'expression spécifique du sexe ou différente entre sexes de gènes de la machinerie épigénétique localisés sur les chromosomes X et Y (*Kdm6* (*Utx*), *Uty*, *Hdac8*, *Kmt1a*). Cela pourrait donc conduire à l'apposition d'un épigénome spécifique du sexe, indépendamment de l'action des hormones (Wijchers & Festenstein, 2011). Cet épigénome « sexué » pourrait apparaître très tôt au cours du développement et contribuer aux réactions différentes entre les sexes au régime et au métabolisme maternel.

Conclusions

L'alimentation, le métabolisme, les pathologies métaboliques de la mère ont un impact sur la morphologie et la fonction placentaire. Or, le dysfonctionnement du placenta peut conditionner la susceptibilité aux maladies plus tard dans la vie. Pour comprendre les mécanismes sous-jacents, l'étude des mécanismes épigénétiques est une des clés mais il existe encore peu d'évidences affirmant l'implication des processus épigénétiques dans la programmation fœtale placentaire. Les études actuelles s'intéressent aux effets d'une condition métabolique particulière de la mère sur la méthylation de l'ADN, au niveau pan-génomique ou au niveau de gènes cibles. Mais ce qui se passe au niveau des modifications des histones n'est pas décrit. Il faudra à l'avenir démontrer quelles marques épigénétiques dans le placenta sont sensibles à l'environnement maternel. Ensuite, il faudra établir le lien entre ces marques spécifiques, l'expression génique et les fonctions placentaires affectées. Enfin, des études seront également nécessaires pour comprendre les conséquences d'une altération de l'épigénome placentaire par la physiologie de la mère sur le devenir de l'enfant à long terme. En parallèle, ces processus sont spécifiques du sexe, ce qui implique certainement des mécanismes épigénétiques, qui sont cependant encore mal documentés. Un effort devra être concentré non seulement sur l'observation de ces différences mâle-femelle, mais aussi et de façon plus importante encore, sur la compréhension des mécanismes sous-jacents.

Références

Aiken, C.E., and Ozanne, S.E. (2013). Sex differences in developmental programming models. *Reprod Camb Engl*, 145, R1-R13.

Anderson, O.S., Sant, K.E., and Dolinoy, D.C. (2012). Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem*, 23, 853-859.

Attig, L., Gabory, A., and Junien, C. (2010). Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13, 284-293.

Bale, T.L. (2011). Sex differences in prenatal epigenetic programming of stress pathways. *Stress Amst Neth,* 14, 348-356.

Barker, D.J. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ*, 301, 1111.

Barker, D.J., Osmond, C., and Law, C.M. (1989). The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *J Epidemiol Community Health*, 43, 237-240.

Barker, D.J.P., Thornburg, K.L., Osmond, C., Kajantie, E., and Eriksson, J.G. (2010a). Beyond birthweight: the maternal and placental origins of chronic disease. *J Dev Orig Health Dis*, 1, 360-364.

Barker, D.J.P., Thornburg, K.L., Osmond, C., Kajantie, E., and Eriksson, J.G. (2010b). The surface area of the placenta and hypertension in the offspring in later life. *Int J Dev Biol*, 54, 525-530.

Beaujean, N. (2014). Histone post-translational modifications in preimplantation mouse embryos and their role in nuclear architecture. *Mol Reprod Dev*, 81, 100-112.

Beaujean, N., Mason, K., Bonnet-Garnier, A., Salvaing, J., and Debey, P. (2010). Organisation du génome embryonnaire après la fécondation chez les mammifères [Embryonic genome organization after fertilization in mammals]. *Biol Auj*, 204, 205-213.

Binder N.K., Hannan N.J., and Gardner D.K. (2012). Paternal Diet-Induced Obesity Retards Early Mouse Embryo Development, Mitochondrial Activity and Pregnancy Health, *PLoS One*, *7*, e52304.

Binder, N.K., Beard, S.A., Kaitu'u-Lino, T.J., Tong, S., Hannan, N.J., and Gardner, D.K. (2015). Paternal obesity in a rodent model affects placental gene expression in a sex-specific manner. *Reprod Camb Engl,* 149, 435-444.

Borengasser, S.J., Faske, J., Kang, P., Blackburn, M.L., Badger, T.M., and Shankar, K. (2014). In utero exposure to prepregnancy maternal obesity and postweaning high-fat diet impair regulators of mitochondrial dynamics in rat placenta and offspring. *Physiol Genomics*, 46, 841-850.

Brett, K.E., Ferraro, Z.M., Holcik, M., and Adamo, K.B. (2015). Placenta nutrient transport-related gene expression: the impact of maternal obesity and excessive gestational weight gain. *J Matern-Fetal Neonatal Med*, 22, 1-7.

Challier, J.C., Basu, S., Bintein, T., Minium, J., Hotmire, K., Catalano, P.M., and Hauguel-de Mouzon, S. (2008). Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*, 29, 274-281.

Clifton, V.L. (2010). Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta,* 31 Suppl, S33-S39.

Cox, L.A., Li, C., Glenn, J.P., Lange, K., Spradling, K.D., Nathanielsz, P.W., and Jansson, T. (2013). Expression of the placental transcriptome in maternal nutrient reduction in baboons is dependent on fetal sex. *J Nutr,* 143, 1698-1708.

Delage, B., and Dashwood, R.H. (2008). Dietary manipulation of histone structure and function. *Annu Rev Nutr, 28*, 347-366.

Doyle, O., Harmon, C.P., Heckman, J.J., and Tremblay, R.E. (2009). Investing in early human development: Timing and economic efficiency. *Econ Hum Biol,* 7, 1-6.

Dubé, E., Gravel, A., Martin, C., Desparois, G., Moussa, I., Ethier-Chiasson, M., Forest, J.-C., Giguère, Y., Masse, A., and Lafond, J. (2012). Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-term placenta. *Biol Reprod*, 87, 14, 1-11.

Finer, S., Mathews, C., Lowe, R., Smart, M., Hillman, S., Foo, L., Sinha, A., Williams, D., Rakyan, V.K., and Hitman, G.A. (2015). Maternal gestational diabetes is associated with genome-wide DNA methylation variation in placenta and cord blood of exposed offspring. *Hum Mol Genet*, 24, 3021-3029.

Forsdahl, A. (1977). Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med*, 31, 91-95.

Frias, A.E., Morgan, T.K., Evans, A.E., Rasanen, J., Oh, K.Y., Thornburg, K.L., and Grove, K.L. (2011). Maternal high-fat diet disturbs uteroplacental hemodynamics and increases the frequency of stillbirth in a nonhuman primate model of excess nutrition. *Endocrinology*, 152, 2456-2464.

Gabory, A., Chavatte-Palmer, P., Vambergue, A., and Tarrade, A. (in press). Impact de l'obésité et du diabète maternels sur la fonction placentaire. *Médecine Sci MS*.

Gabory, A., Attig, L., and Junien, C. (2011). Developmental programming and epigenetics. *Am J Clin Nutr*, 94, 1943S-1952S.

Gabory, A., Ferry, L., Fajardy, I., Jouneau, L., Gothié, J.-D., Vigé, A., Fleur, C., Mayeur, S., Gallou-Kabani, C., Gross, M.-S., Attig, L., Vambergue, A., Lesage, J., Reusens, B., Vieau, D., Remacle, C., Jais, J.P., and Junien, C. (2012). Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. *PloS One*, 7, e47986.

Gabory, A., Roseboom, T.J., Moore, T., Moore, L.G., and Junien, C. (2013). Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biol Sex Differ*, 4, 5.

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

Godfrey, K.M. (2002). The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta*, 23 Suppl A, S20-S27.

Hajj, N. El, Pliushch, G., Schneider, E., Dittrich, M., Müller, T., Korenkov, M., Aretz, M., Zechner, U., Lehnen, H., and Haaf, T. (2013). Metabolic programming of MEST DNA methylation by intrauterine exposure to gestational diabetes mellitus. *Diabetes*, 62, 1320-1328.

Hanson, M.A., and Gluckman, P.D. (2014). Early Developmental Conditioning of Later Health and Disease: Physiology or Pathophysiology? *Physiol Rev*, 94, 1027-1076.

Hastie, R., and Lappas, M. (2014). The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity. *Placenta,* 35, 673-683.

Haute Autorité de Santé (2013). Extrait de l'argumentaire scientifique de la Recommandations de bonne pratique : « Stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2 ». Chapitre : Epidémiologie et coût du diabète de type 2 en France.

Huang, L., Liu, J., Feng, L., Chen, Y., Zhang, J., and Wang, W. (2014). Maternal prepregnancy obesity is associated with higher risk of placental pathological lesions. *Placenta*, 35, 563-569.

Jones, H.N., Woollett, L.A., Barbour, N., Prasad, P.D., Powell, T.L., and 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*, 23, 271-278.

Junien, C., Gallou-Kabani, C., Vigé, A., and Gross, M.-S. (2005). Épigénomique nutritionnelle du syndrome métabolique [Nutritional epigenomics of metabolic syndrome]. *Médecine Sci MS,* 21 Spec No, 44-52.

Kim, D.W., Young, S.L., Grattan, D.R., and Jasoni, C.L. (2014). Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biol Reprod*, 90, 130.

King, V., Hibbert, N., Seckl, J.R., Norman, J.E., and Drake, A.J. (2013). The effects of an obesogenic diet during pregnancy on fetal growth and placental gene expression are gestation dependent. *Placenta*, 34, 1087-1090.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell 128*, 693-705.

Lee, S.-A., and Ding, C. (2012). The dysfunctional placenta epigenome : causes and consequences. *Epigenomics,* 4, 561-569.

Lesseur, C., Armstrong, D.A., Paquette, A.G., Li, Z., Padbury, J.F., and Marsit, C.J. (2014). Maternal obesity and gestational diabetes are associated with placental leptin DNA methylation. *Am J Obstet Gynecol*, 211, 654.e1-e9.

Li, N., and Carrel, L. (2008). Escape from X chromosome inactivation is an intrinsic property of the Jarid1c locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 17055-17060.

Li, Y., Saldanha, S.N., and Tollefsbol, T.O. (2013). Impact of Epigenetic Dietary Compounds on Transgenerational Prevention of Human Diseases. *AAPSJ*, 16, 27-36.

Liang, C., DeCourcy, K., and Prater, M.R. (2010). High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism*, 59, 943-950.

Maccani, M.A., Avissar-Whiting, M., Banister, C.E., McGonnigal, B., Padbury, J.F., and Marsit, C.J. (2010). Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with downregulation of miR-16, miR-21, and miR-146a in the placenta. *Epigenetics,* 5, 583-589.

Mao, J., Zhang, X., Sieli, P.T., Falduto, M.T., Torres, K.E., and Rosenfeld, C.S. (2010). Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc Natl Acad Sci USA,* 107, 5557-5562.

Marsit, C.J. (2015). Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *J Exp Biol,* 218, 71-79.

Mele, J., Muralimanoharan, S., Maloyan, A., and Myatt, L. (2014). Impaired mitochondrial function in human placenta with increased maternal adiposity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 307, E419-E425.

Monk, C., Spicer, J., and Champagne, F.A. (2012). Linking prenatal maternal adversity to developmental outcomes in infants : the role of epigenetic pathways. *Dev Psychopathol*, 24, 1361-1376.

Myatt, L. (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol*, 572, 25-30.

Nomura, Y., Lambertini, L., Rialdi, A., Lee, M., Mystal, E.Y., Grabie, M., Manaster, I., Huynh, N., Finik, J., Davey, M., Davey, K., Ly, J., Stone, J., Loudon, H., Eglinton, G., Hurd, Y., Newcorn, J.H., and Chen, J. (2014). Global methylation in the placenta and umbilical cord blood from pregnancies with maternal gestational diabetes, preeclampsia, and obesity. *Reprod Sci,* 21, 131-137.

Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé (2005). Rapport de l'OPEPS n° 8. Expertise collective Inserm. La prévention et la prise en charge de l'obésité.

Organisation Mondiale de la Santé (2010). Rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles.

Picone, O., Laigre, P., Fortun-Lamothe, L., Archilla, C., Peynot, N., Ponter, A.A., Berthelot, V., Cordier, A.-G., Duranthon, V., and Chavatte-Palmer, P. (2011). Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology,* 75, 287-299.

Poston, L., Harthoorn, L.F., and van der Beek, E.M. (2011). Obesity in Pregnancy : Implications for the Mother and Lifelong Health of the Child. A Consensus Statement. *Pediatr Res*, 69, 175-180.

Roeder, L.M., and Chow, B.F. (1972). Maternal undernutrition and its long-term effects on the offspring. *Am J Clin Nutr*, 25, 812-821.

Ruchat, S.-M., Hivert, M.-F., and Bouchard, L. (2013a). Epigenetic programming of obesity and diabetes by in utero exposure to gestational diabetes mellitus. *Nutr Rev*, 71 Suppl 1, S88-S94.

Ruchat, S.-M., Houde, A.-A., Voisin, G., St-Pierre, J., Perron, P., Baillargeon, J.-P., Gaudet, D., Hivert, M.-F., Brisson, D., and Bouchard, L. (2013b). Gestational

diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics,* 8, 935-943.

Saben, J., Kang, P., Zhong, Y., Thakali, K.M., Gomez-Acevedo, H., Borengasser, S.J., Andres, A., Badger, T.M., and Shankar, K. (2014). RNA-seq analysis of the rat placentation site reveals maternal obesity-associated changes in placental and offspring thyroid hormone signaling. *Placenta*, 35, 1013-1020.

Sood, R., Zehnder, J.L., Druzin, M.L., and Brown, P.O. (2006). Gene expression patterns in human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA,* 103, 5478-5483.

Suter, M.A., and Aagaard, K. (2012). What changes in DNA methylation take place in individuals exposed to maternal smoking in utero ? *Epigenomics, 4*, 115-118.

Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D., Aubrière, M.-C., Peynot, N., Dahirel, M., Bertrand-Michel, J., Aguirre-Lavin, T., Morel, O., Beaujean, N., Duranthon, V., and Chavatte-Palmer, P. (2013). Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a high fat and control maternal diets in a rabbit model. *PloS One,* 8, e83458.

Tarrade, A., Panchenko, P., Junien, C., and Gabory, A. (2015). Placental contribution to nutritional programming of health and diseases : epigenetics and sexual dimorphism. *J Exp Biol,* 218, 50-58.

Thornburg, K.L., O'Tierney, P.F., and Louey, S. (2010). Review : The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. *Placenta,* 31 Suppl, S54-S59.

Warner, M.J., and Ozanne, S.E. (2010). Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J,* 427, 333-347.

Wijchers, P.J., and Festenstein, R.J. (2011). Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trends Genet,* 27, 132-140.

Williams, L., Seki, Y., Vuguin, P.M., and Charron, M.J. (2014). Animal models of in utero exposure to a high fat diet : a review. *Biochim Biophys Acta,* 1842, 507-519.

Xu, J., Burgoyne, P.S., and Arnold, A.P. (2002). Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain. *Hum Mol Genet*, 11, 1409-1419.

CHAPTER

20

Sexual Dimorphism and DOHaD through the Lens of Epigenetics: Genetic, Ancestral, Developmental, and Environmental Origins from Previous to the Next Generation(s)

Claudine Junien, Sara Fneich, Polina Panchenko, Sarah Voisin, Anne Gabory

INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, France

OUTLINE

Introduction 390

Complex Trajectories due to Sex Specificity to Both the Transmission and Inheritance of Susceptibility 395

Sexual Dimorphism and Nongenetic Heritability 395

Resilience–a Neglected Approach 395

Transgenerational Responses to Programming: A Vicious Circle or Resilience? 396

Mechanisms of Unequal Expression of X- and Y-Chromosome-Linked Genes 397

Early Involvement of Sex Chromosomes in Sex Differences 397

Sex Differences: Sex Hormones and/or Sex Chromosomes? 398

Unequal Dosage and Compensation Mechanisms between Males (XY) and Females (XX) 398

Male-Specific Y Chromosome Genes 399

Epigenetics and Gene Expression: Sex-Specific Marks, Mechanisms, and Dynamics 399

Sex-Specific Epigenetic Marks Modulate Sex-Specific Gene Expression 400

Sex-Specific Impact of Environmental Influences 400

The Special Case of X/Y Pairs of Paralogues 401

The Epigenome and Developmental Origins of Health and Disease
http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801383-0.00020-7

Copyright © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

The Specific Epigenetic Features of Extraembryonic Tissues and Placenta 402
The Specific Features of the Placenta 403
Sex Differences: Sex Hormones and/or Sex Chromosomes? 404

Differences between Male/Female Gametogenesis 404
Even before Conception for the Future Father and the Mother 404

Differences in Reprogramming of Maternal/Paternal Genome 408
Environmental and Metabolic Programming from Fertilization to Preimplantation 408
The Various Phases of Reprogramming and the Twists of Mark Erasure 408
Mysterious Intermediaries Passing on the Message from Generation to Generation 411
Noncoding RNAs 412
Skip in Generation 412
Persistence? 413

What Levels of Evidence: The Limiting and Confounders Factors 413

Conclusions 414

References 416

INTRODUCTION

For many decades human studies and animal models have focused on describing the differences between the sexes in terms of disease occurrence, presentation, and severity and examining their relationship with different hormonal contexts. However, considering only, on the one hand, the end course, that is, the adult phenotype with distinct mechanisms of sex-dependent gene regulation in male and female, and, on the other hand, relying solely on the gonad-centric model is blatantly insufficient [1]. Indeed there is now substantial evidence that if we want to provide new cues to prevent diseases in both men and women there is an urgent need to unravel globally new aspects integrating the actual roots and mechanisms of sexual dimorphism and as far as we can go back in time and in previous generations.

Our capacity to respond to the various challenges and hazards of life, and to stress and risks of disease, during childhood and adulthood, depends on the health and human capital with which we are born [2], as supported by the concept of the developmental origins of health and disease (DOHaD) [3]. Moreover, sex-specific nongenetic and noncultural transmission of consequences of various experiences and exposures to environment to subsequent generations may also occur [4–9]. The notion that these mechanisms are able to transmit the memory of exposure to diverse environmental conditions to subsequent generations, conditioning their reactions, has excited considerable interest and has brought the long-criticized proposals of J.B. Lamarck back into the limelight (Box 1). Thus, the DOHaD covers all aspects of the life cycle, in a sex-specific manner, and three phases can be distinguished: (1) developmental plasticity, (2) long-term effects, and (3) transgenerational responses. Indeed sex-specific nongenetic and noncultural transmission of various experiences and exposures to environment consequences to subsequent generations may also occur in a sex-specific manner [4–8,10]. Sexual dimorphism in the DOHaD context is a universal transversal phenomenon affecting not just humans but all kinds of species and is little understood, except that it is widely considered to be an outcome of both genetics and epigenetics.

BOX 1 THE CARVING BEHIND THE BASE SHOWS JEAN-BAPTISTE LAMARCK AND HIS DAUGHTER, AMÉNAÏDE CORNÉLIE. IT BEARS THE INSCRIPTION: "*LA POSTÉRITÉ VOUS ADMIRERA, ELLE VOUS VENGERA, MON PÈRE*" (POSTERITY WILL ADMIRE YOU AND AVENGE YOU, FATHER)

Jean-Baptiste Pierre Antoine de Mont, Chevalier de Lamarck (1774–1829) was a French biologist/zoologist and anatomist who made a major contribution to the classification of life forms through his four laws:

> First law: Life, through its own forces, tends to increase continually the volume of any body that it possesses and to extend the dimensions of its parts to a limit that it itself defines.
> Second law: The production of a new organ in the body of an animal results from a new need that occurs and continues to be felt and a new movement that needs to be born and maintained.
> Third law: The development of the organs and their force of action is constantly consistent with the use of these organs.
> Fourth law: All that has been acquired, traced, or changed in the organization of individuals, during their lifetime, is conserved by the generation concerned and is transmitted to the new individuals produced by those that have experienced these changes.

Nongenetic transmission processes are often described as Lamarckian because they raise the possibility of inheriting characteristics acquired by previous generations. The key characteristics of Lamarckian mechanisms are (1) an environmental factor directly causing "heritable" changes; (2) the changes induced target a limited set of cell components of functional relevance; (3) the changes provide a specific adaptation to the initial challenge. However, the proof of concept for a role of epigenetic processes in Lamarckian evolution remains tenuous or fragmentary. The fourth law, which was formulated two centuries ago, may seem to go against the finding that the epigenetic marks carried by the gametes are extensively erased after fertilization, ensuring a state of totipotency that should not allow the passage of information about the experiences of parents or ancestors. However, Lamarck began from the notion that a change in environment provokes changes in the needs of the organisms living in that environment, in turn triggering changes in their behavior. These changes in behavior lead to greater or lesser use of the organ concerned, resulting in changes in the size of the organ (increases in size or disappearance) over time and generations.

There is a need to address the questions of when and where these sex-specific genetic and epigenetic processes arise, and how the latter are maintained, erased, or give rise to new ones. Not only because sex differences based on the genetic composition of a female or a male that differ by their pair of sex chromosomes (XX and XY) appear well before gonad differentiation as early as fertilization, but also because of recent data based on the new paradigm of DOHaD, these insights compel us to revise generally held notions to accommodate the prospect that biological parenting commences well before birth, even prior to conception.

The consequences of environmental factors including diet, endocrine disruptors, chemical products, or other psychoaffective, geographic, political, or socioeconomic influences can simultaneously affect at least three generations the mother and father (F0), their children (F1), and their grandchildren (F2)—through somatic and/or germ line changes in the F1 generation (Figure 1). Our experiences in utero and during the first two years of life (the 1000-days concept) are a clear determinant of our health and human capital [2]. However, the phases preceding conception, beginning with gametogenesis and distinguishing between effects on the primordial germ line cells, the gametes, are also important and must be taken into account [10] (Figure 1). Yet whether there is transmission by the mother or the father, a lack of knowledge and a great confusion persists between different types of transmission and the postulated mechanisms. Indeed, although the term *transgenerational* may be used interchangeably, one must distinguish the transgenerational effects from intergenerational or multigenerational effects [11–13] (Figure 1). Early environmental events may disturb the precisely timed processes that sculpt the embryo and fetus in a sex-dependent manner and thus influence his or her health in later life [14,15]. All environmental factors therefore can change or perturb gene expression of all genes, including sexually dimorphic genes, depending on the developmental window(s), the timing, duration, dose, and potential synergy/antagonism with other factors, the type of tissue, and most of all on whether the individual is a male or a female.

Moreover, not only the phenotypic effect of an ancestral exposure can vary across generations but nongenetic sex-specific transmission of exposure to environment to subsequent generations may also vary. We now know that what the grandparents and the parents endured or were exposed to throughout their lives, during critical windows and in specific cell types/systems, can make a difference and especially so whether we consider the grandson or the granddaughter and his/her responses to the environment and their outcomes, and how they do so whether it is transmitted through the paternal or maternal lineage [12]. Studies on sexual dimorphism for gene expression and epigenetic marks and modifiers reveal the existence of different adaptation mechanisms to these environmental factors in males and females in their somatic tissues, germ line, and reproductive systems. As highlighted particularly well in adult mouse liver studies on the potential underpinning epigenetic mechanisms, conspicuous differences in epigenetic marks and modifiers and in chromatin conformation have been revealed [16]. The challenges of unraveling the complexities associated with sex specificity are manifold due to multiple levels of interdependence between the different routes involved in transmission to the next generation(s) [12]. Thus, unraveling the origin, targets, and consequences of parent-specific transfer of information is also key to understanding the underpinning epigenetic mechanisms of sexual dimorphism.

The World Health Organization predicts a 17% increase in noncommunicable diseases (NCDs) for the next decade. Recent data demonstrate that, complementary to genetic-based approaches, the DOHaD concept now largely accounts for most of the unexplained heritability (75%) and thus represents a timely major approach for the prevention of the alarmingly

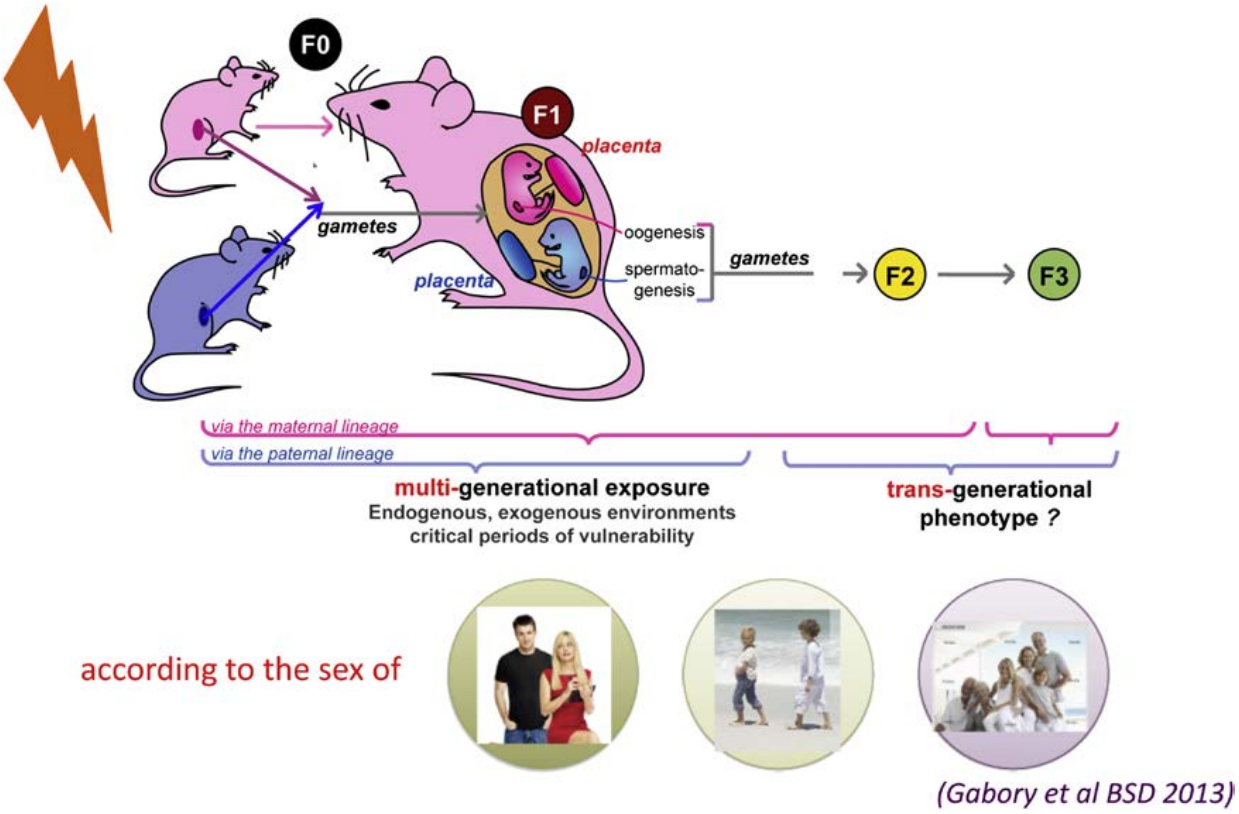


FIGURE 1 **Sex-specific transmission of the memory of exposure to environmental factors to subsequent generations.** Environmental factors, including nutrition, psychosocial stress, toxins, endocrine disruptors, tobacco, alcohol, and microbiota, affect individual (F0) epigenetic landscapes and, therefore, gene pathways and networks, in ways that differ between the sexes. For example, maternal and paternal exposures before the conception of their offspring can modify gamete quality, and information about these exposures can be transmitted to the next (F1) generation. In addition, the consequences of maternal (F0) exposure during pregnancy (stress, metabolism, diet, hormonal changes, etc.) can be transmitted from the maternal to the fetal compartment via the placenta, in a sex-specific manner, with effects on F1 tissue development. The programming of somatic tissues can lead to changes in long-term health outcomes in the first generation. Moreover, primordial germ cells, which develop and undergo reprogramming during fetal development, can also be affected by the F0 maternal environment and may transmit genetic and epigenetic information to the F2 generation. These influences are transmitted differently by the maternal and paternal lineages. In particular, multigenerational exposure in the maternal lineage can be seen in the F0, F1, and F2 generations, with a transgenerational phenotype observed in the F3, whereas, in the paternal lineage, multigenerational exposure concerns the F0 and F1 generations, and a transgenerational phenotype is seen in the F2 and F3 generations. *From Ref. [10].*

increasing incidence of NCDs [17]. While recent studies have shown the usefulness of the study of sex differences, we need to raise the awareness of scientists on the existence of sexual dimorphism. The majority, including scientists, ignores that every cell has a sex, based on the sexual pair of chromosomes, XX or XY. In a recent *Nature* paper (May, 2014) Janine A. Clayton and Francis S. Collins unveil policies to ensure that preclinical research funded by the US National Institutes of Health considers females and males [18]. What a pregnant mother consumes in her diet, her body mass and general health, her exposure to environmental chemicals, the stress she experiences, and her education and socioeconomic status have each been proposed to have subsequent health effects on her offspring. Because of

the lack of plausible biological mechanisms, paternal exposures were not taken in to consideration. Recent data demonstrate, however, that even the future father may contribute to DOHaD, through environmental influences on his germ cells during the prepubertal period and on his gametes, as well as through interactions with the mothers [19] (Figure 2). Therefore,

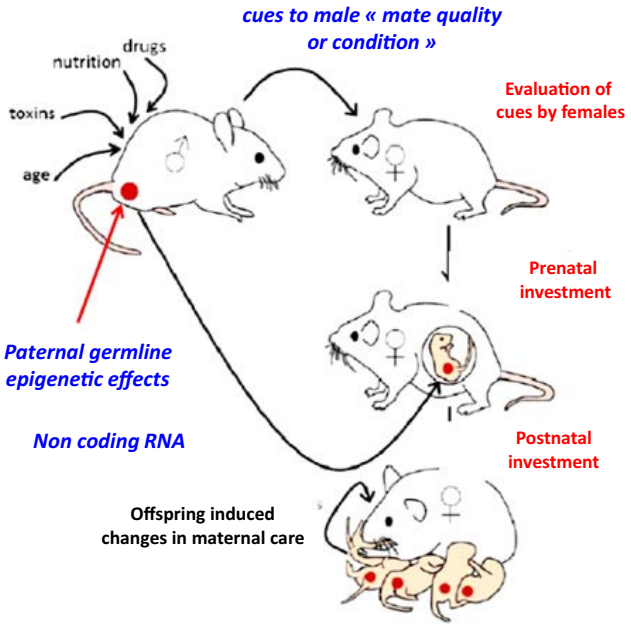


FIGURE 2 **Illustration of the nongenomic pathways through which paternal effects on offspring development may occur.** The experiences of males (drugs, nutrition, toxins, age, stress), particularly during early development, may lead to epigenetic alterations in the male germ line (red circle), which are then transmitted to the offspring with consequences for phenotypic variation. Alternatively, or probably in combination with these direct paternal effects, the experiences of a male before mating may lead to changes in mate quality or preference, which may be assessed by the female at the time of mating. This assessment may lead to differences in maternal prenatal and/or postnatal investment in the growth and development of the offspring generated from this mating, with consequences for phenotypic variation in the offspring. Maternal investment may also vary with paternally mediated variations in offspring phenotype, during both the prenatal and postnatal periods. Differences in maternal investment as a function of paternal experiences or offspring traits may either enhance transmission of the memory of paternal exposure or compensate for deficits in functioning due to that exposure. *From Ref. [19].*

altogether the differences in exposures and in responses for the two sexes/genders both at the transmission (parents) and at the inheritance (offspring) levels, within specific vulnerable windows, will shape the outcome for the offspring in early and later adult life in a sex-dependent manner. Therefore, there is an urgent need to consider both men and women, both parents, boys and girls for better health throughout the world, and to apply truly personalized medicine based on sex/gender. A comprehensive understanding of all the mechanisms that lead to altered sex-specific fetal programming will eventually allow a shift from understanding how DOHaD leads to disease to improved methods for avoiding at-risk exposures during critical windows and to reinforce choices that favor prevention and alleviation of diseases with a DOHaD basis in a sex/gender perspective.

In evolutionary terms, sex-specific differences in health and diseases can be considered as the by-products of contradictory forces that drove sex-specific selection to reach separate fitness optima in mating systems and as trade-offs between reproduction and survival [20]. The potential for sexual conflicts is predicted to increase with the magnitude of difference in mating success. However, given the differences between men and women and the recent abrupt increase in life span expectancy in most populations, it can be expected that some differences can be blurred and other may appear in the elderly [21].

The aim of this review is not to describe the abundant literature on sex differences but to go deeper into the genetic differences that lead to epigenetic differences that modulate gene expression at different stages during the life cycle. While the relevance of epigenetic processes is not universally accepted for some aspects and is still a matter of hot debate, other mechanisms have been proposed but are not within the scope of this review.

COMPLEX TRAJECTORIES DUE TO SEX SPECIFICITY TO BOTH THE TRANSMISSION AND INHERITANCE OF SUSCEPTIBILITY

Sexual Dimorphism and Nongenetic Heritability

As for the transmission to future generations, through an epigenetic mechanism, it is still not as obvious in humans, but evidence is accumulating in rodents and more in nematodes, fruit flies, and especially for plants [22–28]. So far, a large number of journals have focused on the inter- or transgenerational effects [29–32]. But this phase, though exciting, corresponds to only one of the three key phases of DOHaD.

Studies of gene expression and epigenetic marks and modifications have revealed the existence of different mechanisms of environmental adaptation in males and females, in both humans and animal models [10,12,19,22,33–35]. The effects of, and responses to programming may affect offspring of both sexes, or may affect one of the sexes more than the other [36–40]. Also, maternal exposure such as a high-fat diet (HFD) can have effects on the third-generation female body size but via the paternal lineage [41]. Furthermore, depending on the nature of the environment, and the developmental window and duration of exposure, the sex of the transmitting parent may also condition the response of the offspring to the environment. Following exposure to toxic substances, alcohol, or under- or overnutrition, during a particular developmental window or after weaning, certain phenotypic characteristics may be inherited solely from the father, solely from the mother, or from both parents equally [19,41,42].

The Overkalix cohort provides a good illustration of these differences. The risk of cardiovascular disease and diabetes in a man or a woman is dependent on the abundance or lack of food to which the grandparents, but only the paternal grandparents, were exposed before puberty [12]. The information is transmitted by the paternal grandfather to his grandsons but not to his granddaughters. Similar results have been reported for rodents, for undernutrition or the consumption of areca nuts [19,43]. The transmission of behavioral characteristics from the father to his female descendants, but not to his male descendants, has also been observed in genetically identical mice displaying phenotypic heterogeneity in terms of behavior [44].

Resilience–a Neglected Approach

The great majority of studies in animals and humans, on inter-, multi-, or transgenerational effects had their focus on deleterious effects on the offspring of deleterious behaviors or exposures of parents and grandparents. Despite long-time study of the capacity to adapt in other species, resilience were not subject to the same attention.

The "resistant" (human or animal) subjects were most of the time neglected, rejected, or not considered [45,46]. More recently surprising results suggestive of resilience resistance, adaptation mechanisms, appeared and are now receiving more attention. Thus, there are now so many examples involving epigenetic mechanisms: odor recognition by the generations that follow the exposed generation, accounting for the enigmatic "innate" fear of the predator [47,48]; social defeat in the father, causing reactions similar to those of the father, susceptibility or resilience, in the offspring [49]; resilience to trauma (PTSD): a demethylation of the DNA at a polymorphism in the DNA sequence, caused by a traumatic episode that persisted in adulthood [50–52]; physical abuse during childhood in the macaque monkey and human [53,54]. Finally, in the nematode *Caenorhabditis elegans*, several experiments demonstrate the ability to transmit a memory of odors [55], virus [56], or famine [57].

Programming of somatic tissues can lead to changes in long-term health outcomes in the first generation. Moreover, primordial germ cells, which develop and undergo reprogramming (that comprises successive phases—erasure, establishment, and maintenance—linked to zygotic erasure after fertilization) during fetal development, can also be affected by F0 maternal environment and contribute genetic and epigenetic information to the F2 generation. Maternal and paternal lineages may affect the transmission of such influences differently due to preconceptional exposure of both the mother and the father to stressful conditions [32]. In particular, multigenerational exposure on the maternal lineage can be seen in the F0, F1, and F2 generations, and transgenerational phenotype would be observed in F3, whereas on the paternal lineage multigenerational exposure concerns F0 and F1, and transgenerational phenotype in F2 and F3 generations.

Interestingly, exposure in the parent may also lead to greater resistance/resilience in the offspring. Despite the well-known deleterious effects of maternal obesity and T2D, the female offspring of obese mothers display greater resistance to the obesogenic effects of an HFD after weaning [58]. Similarly, fathers exposed to environmental factors, such as carbon tetrachloride or bile duct ligation triggering liver damage, display deleterious effects of exposure, whereas their offspring are better adapted to cope with future fibrogenic challenges to the liver or display a cocaine-resistant phenotype, respectively, in a sex-dependent manner. Resistance to liver fibrosis is observed in the son and grandson of rats treated with carbon tetrachloride [13]. The same phenomenon is observed in addiction to cocaine in rats. The male progeny of addicted fathers showed reduced cocaine reinforcement [59].

The main challenge is identifying the means by which this information linked to environmental consequences or a physiopathological change is carried and transferred from one generation to another in a sex-specific manner. The principal avenues of research have converged on certain regions of DNA (genes, repeated sequences, etc.) in which epigenetic marks may partially escape from the successive phases of reprogramming—erasure, establishment, and maintenance—linked to zygotic erasure after fertilization. It has been suggested that these regions could carry or mediate persistent changes in chromatin configuration following exposure to an environmental factor. The involvement of noncoding RNAs (short and long) is also becoming increasingly evident [60]. Also, it is clearly emerging that many new vectors, such as exosomes, prions, metabolites, pathogens, chemical substances, and the maternal microbiota, also have nonnegligible roles [22].

Transgenerational Responses to Programming: A Vicious Circle or Resilience?

The programming occurring, always under the influence of the environment during development, or inherited from parents, may be seen as the "first event." It often confers no more than a latent state, a sensitivity to a "second event," and is revealed later by an accumulation of environmental risk factors, leading to a threshold being crossed. It does not, therefore, strictly correspond to long-term "effects." Instead, it relates to all elements conditioning the "response capacity" (increases or decreases) of programmed tissues or organs conferring a predisposition to vulnerability or resilience. Throughout these processes, it is also dependent on genetic background and shows sex-specific responses.

Most phenotypic studies have been limited to explorations of the system disturbed by parental or ancestral exposure: metabolism for nutritional exposure or behavior for stress exposure, for example. However, depending on the stage of exposure, these disturbances may affect different systems or even all systems. Thus, paternal exposure to stress has been linked not only to behavioral problems but also to metabolic

problems in descendants [61]. The phenotyping of descendants in animal models generally focuses on deleterious effects, thus ignoring the nonnegligible proportion of "resistant" subjects with positive adaptive responses to the exposure of their parents or grandparents [38,45]. Given our present state of ignorance, such limited analysis is unwise. Most human multigenerational cohorts have a range of measures that would allow studies to address the question of whether outcomes in descendants are limited to the F0 or also to subsequent generations.

Nevertheless, studies in *C. elegans* and *Drosophila* have revealed the existence, in some cases, of an ability to adapt, or resilience. Programming can endow networks of genes with a capacity to respond more rapidly to an environmental challenge [62]. Responses opposite to the initial effects may also be observed. For example, in the Overkalix cohort (Sweden), male malnutrition before adolescence was found to lead to a lower risk of cardiovascular death two generations later [45]. Enriched environments may also induce a favorable transgenerational response, with better performance or a better protective or compensatory response in cases of misprogramming [63]. Finally, interactions between the father and mother and between the young and their mother are relevant [19,64,65]. The responses observed in descendants may therefore be diverse and may differ from the effects of the initial impact on the parent, with anything from the vicious circle most frequently reported to an adaptation opening up new possibilities.

MECHANISMS OF UNEQUAL EXPRESSION OF X- AND Y-CHROMOSOME-LINKED GENES

Early Involvement of Sex Chromosomes in Sex Differences

Early after fertilization, the difference in chromosome makeup between mammalian males (XY) and females (XX) leads to sex-specific differences in gene expression. Even before implantation and the initiation of adrenal and gonad development, transcriptional sexual dimorphism is present in various species that has consequences for developmental competence and adult health and disease [66]. For example, in bovine blastocysts, sex determines the expression levels of one-third of all actively expressed genes [67]. Sexual dimorphism has also been observed in embryonic cells isolated from mice at E10.5. These cells responded differently to dietary stressors even before the production of fetal sex hormones [68]. This applies not only for epigenetic modifiers but also for a substantial proportion of genes encoded by both the X and Y chromosomes, in every cell. This difference in expression triggers sex-specific differences in epigenetic marks on specific sets or networks of genes and therefore for a different setting up and reading of the epigenome between men and women. These differences occur well before adrenal and gonad differentiation, in the absence of sex hormones, thus at a stage when only X- and Y-chromosome-linked genes can make the difference. They therefore shape male and female tissues/organs differently during the course of development. In all adult tissues, due to quantitative and qualitative differences in gonadal hormones and in X-linked and Y-linked genes, in various respective proportions, sex-specific differences in gene expression are observed for, on average, 30% of the genes. However, this sexual dimorphism differs between tissues, at different developmental stages, according to circadian rhythms and with aging. Little is known about the underlying mechanisms but epigenetic mechanisms are involved.

This will emphasize the need to focus on the preconception (fathers and mothers) and early life (mother and child) periods. It is therefore not surprising that from the very beginning of life and throughout life, males and females respond differently to intrinsic and extrinsic factors. One (or the other) sex is therefore more susceptible or more prone to resisting the ups and downs of

life than the other sex and therefore may be more susceptible or resistant to the deleterious effects of some environmental factors or lifestyles or to developing a disease or to adapting better.

Sex Differences: Sex Hormones and/or Sex Chromosomes?

Increasing numbers of reports are challenging the traditional view regarding the influences of gonadal hormones and highlighting the potential roles for sex chromosomes (reviewed in Refs [35,69–71]). Sex-linked genes and sex hormones may work together to yield similar differences in physiology between the sexes in brain. For instance, immune responses and cytokine production, or sex-linked genes like the androgen receptor, or Y-linked genes may exhibit sex differences because they can be influenced differently by steroid hormones (reviewed in Ref. [72]). Thus, unfavorable programming, whether immediately before conception or during gestation, may result in various defects potentially translated into differences in susceptibility to disease between males and females [35,70,73–77].

Unequal Dosage and Compensation Mechanisms between Males (XY) and Females (XX)

Mammals have a very complex, tightly controlled, and developmentally regulated process of dosage compensation between males (XY) and females (XX). Two main kinds of dosage compensation exist: the first being to avoid X hyperexpression in females by equalizing the expression of the X-linked genes via inactivation of one of the two X chromosomes in females (XCI: X-chromosome inactivation), and the second leading to the balanced expression between X-linked and autosomal genes via transcriptional upregulation of the active X in both sexes, males and females. There are two forms of XCI: imprinted and random [78,79].

However, not all X-linked genes are absolutely balanced. Several X-linked genes can escape XCI. More genes escape XCI in humans than in the mouse. While it has been estimated that 15–25% of the 1400 X-linked human genes escape XCI in humans, only 3% do so in the mouse [80–82]. There are also significant differences in terms of the distribution of « escape genes » in humans and mouse, with a random distribution along the mouse X chromosome, suggesting that escape is controlled at the level of individual genes rather than chromatin domains. This suggests that men and women may demonstrate greater sex differences in X-linked gene expression than mice as a result of the large number of escape genes. In addition, the degree of escape, hence the expression levels from inactive X, can vary considerably between loci, ranging from 5% to >75% of active X levels [80]. Although there are no data on the laboratory mouse, it is interesting that in common voles, more genes were expressed on the inactive X chromosome in extraembryonic tissues than in somatic tissues [83]. Escape from XCI can vary between different tissues and/or individuals and the escape can also be developmentally regulated. In mice, silencing of some X-chromosomal regions occurs outside of the usual time window, and escape from XCI can be highly lineage specific [78,84,85].

Before implantation, X chromosome inactivation (XCI) is not accomplished and 2X are active in most blastomeres. Thus, at this stage females express a double dose of X-linked genes.

There are also additional control mechanisms to achieve balanced or unbalanced expression between the sexes. Some genes on the X chromosome are imprinted: their expression is monoallelic, depending on the parental origin of the allele. Recently, three genes have been described as imprinted and expressed from the paternal X allele: Fthl17, Rhox5, and Bex1. This monoallelic paternal expression is independent of XIC. Therefore, these genes are expressed predominantly in females [86].

Globally in bovine blastocyst these differences result in a sexually dimorphic gene expression of one-third of the genes [67]. While autosomal

genes are involved, sex chromosomes are overrepresented. After random X inactivation, the genes that escape XCI and their variations of expression between tissues may play an important role in the genetic imbalance between males and females.

Male-Specific Y Chromosome Genes

Beyond its roles in testis determination and spermatogenesis, the Y chromosome is essential for male viability [87] (Figure 3). Moreover, as shown recently, with the inheritance of coronary artery disease in men associated with Y chromosome haplotypes [88], the Y Chr, with its 36 male-specific genes including SRY has unappreciated roles in phenotypic differences between the sexes in health and disease [89–91]. In addition to unequal expression of X-linked genes, the small number of expressed genes present on the Y chromosome (and therefore only expressed in males) may be involved. In humans, 29 genes are conserved in the pseudoautosomal regions of the X and Y chromosomes [92]. The nonrecombining, male-specific Y region contains about 27 protein-coding genes [93]. Some X/Y gene pairs have been retained on sex chromosomes and are referred to as paralogues [87]. In the case of X/Y pairs, in contrast to humans, for which a number of X escapees do not have a Y paralogue, all known mouse escapees do have a Y paralogue [87,94,95]. Studies in mice and rats demonstrating sex differences in placental responses to changes in the maternal environment may thus indicate a role for these escaped genes, as the placentas of female fetuses may produce small differences in the amount of the corresponding proteins compared to amounts present in male fetuses. However, there are very few studies comparing levels of mRNA and proteins for escape versus nonescape genes [69,96].

EPIGENETICS AND GENE EXPRESSION: SEX-SPECIFIC MARKS, MECHANISMS, AND DYNAMICS

Within the context of DOHaD, epigenetic marks, which respond to the environment, record the effects of the environment during development in a sex-specific manner [97]. Developmental alterations to epigenetic marks may induce long-term changes in gene

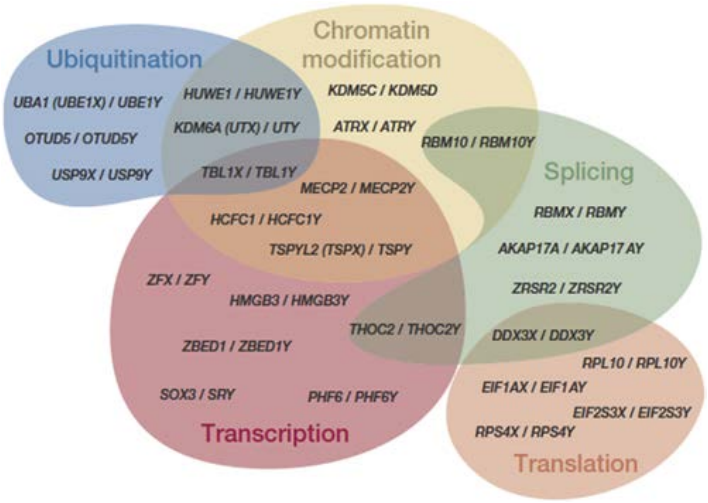


FIGURE 3 **Regulatory annotations of X–Y pair genes.** Venn diagram depicting regulatory functions predicted for selected X–Y pair genes on basis of UniProt annotations of human X homologue. Common alternatives to official gene symbols in parentheses. *From Ref. [87].*

expression, potentially leading to disease in later life [14,98]. Early after fertilization, sex-specific differences in epigenetic modifiers are observed [67,99]. These differences in gene expression may trigger sex-specific differences in epigenetic marks [100]. This occurs well before adrenal and gonad differentiation, in the absence of sex hormones, thus at a stage when only X- and Y-chromosome-linked genes can make the difference.

However, even with recent developments in this field, we still know little about the mechanisms underlying the early sex-specific epigenetic marks resulting in sex-biased gene expression of pathways and networks. Are these marks established early and permanent or are they continuously rearranged throughout life? Little is known about the timing, persistence, and continuity of gene expression required in the creation of distinct male and female phenotypes, and even less is known about how sex-specific selection pressures shift over the life cycle. In male mouse, liver developmental changes in mRNA abundance occur for all major known epigenetic modifiers [101]. In the chicken, the amount and magnitude of sex-biased expression increased as a function of age, though sex-biased gene expression was surprisingly ephemeral, with very few genes exhibiting continuous sex bias in both embryonic and adult tissues [102]. Do the sex-specific patterns observed in adult liver by D. Waxman and coworkers reflect what happened in earlier stages [16]? Epigenetic marks are dynamic throughout development, circadian rhythms, and aging. But are there stable sex-specific marks that help the individual remember its sex and environmental impacts [103,104]?

Sex-Specific Epigenetic Marks Modulate Sex-Specific Gene Expression

The study of the epigenetic marks and mechanisms underlying sex differences is in its infancy. The expression of key enzymes of the epigenetic machinery mapping to autosomes also appears to be sex dependent, even at early stages [99,105]. Levels of *Dnmt1* are similar in male and female bovine embryos, but *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are produced in smaller amounts in female embryos [99]. Levels of DNA methylation have been reported to be lower in XX ES cell lines than in XY or XO lines, and this hypomethylation is thought to be associated with lower levels of *Dnmt3a* and *Dnmt3b* [106]. In mouse placenta, global DNA methylation is also sexually dimorphic in animals fed the CD (control diet), with lower methylation levels in the placentas of male offspring than in those of female offspring at E15.5 stage [15]. In all adult tissues examined to date, including the gonads and brain, the expression of many genes is modulated in a sex-specific manner [70,107,108]. Chromatin structure and epigenetic marks differ between male and female samples in brain [109,110]. The adult liver is the organ in which these aspects have been best characterized, with genome-wide chromatin states, DNaseI-hypersensitive sites, and sex-specific gene expression detected [16,111–114]. However, even with recent developments in this field, we still know little about the mechanisms underlying the early sex-specific expression of genes and gene networks resulting from epigenetic regulation in every tissue.

Sex-Specific Impact of Environmental Influences

Within the context of DOHaD, epigenetic marks, which respond to the environment, record the effects of the environment during development in a sex-specific manner [97]. Developmental alterations to epigenetic marks may induce long-term changes in gene expression, potentially leading to sex-specific susceptibility to disease in later life [14,98]. Efforts are now being made to determine the contribution of epigenetics to the establishment and maintenance of sex differences.

Under HFD, hypomethylation was observed only in the female placenta. Consistent with this observation, expression of the gene encoding the DNA methyltransferase cofactor *Dnmt3l* was downregulated in females only [15,76]. Clearly, further studies are needed to understand the direct effects of sex chromosomes and gonadal hormones on the regulation of genes controlling histone acetylation and methylation, coregulatory proteins, and transient and stable DNA methylation patterns.

Expression analysis has also shown that maternal HFD affects mouse placental gene expression in a sexually dimorphic manner [15]. An HFD during gestation triggers the deregulation of clusters of imprinted genes. Sexual dimorphism and sensitivity to diet were observed for nine of 20 imprinted genes, from four clusters on mouse chromosomes 6, 7, 12, and 17. An analysis of CpG methylation in the DMR of the chromosome 17 cluster revealed sex- and diet-specific differential methylation of individual CpGs in two conspicuous subregions. Bioinformatic analysis suggested that these differentially methylated CpGs might lie within recognition elements or binding sites for transcription factors or factors involved in chromatin remodeling [76]. Gregg et al. recently reported sexually dimorphic genomic imprinting in the brain, with sex-specific imprinted genes found mostly in females [115,116]. Given the importance of genomic imprinting in the brain and placenta, this provides new clues for further investigations of sexual dimorphism in the placenta.

The Special Case of X/Y Pairs of Paralogues

In the same study, transcriptomic analysis showed that both basal gene expression and response to maternal HFD were sexually dimorphic in whole placentas. The differences between the sexes in the transcriptomic response to HFD were not only quantitative but also qualitative. The biological functions and networks of genes dysregulated differed markedly in sex-specific ways, with involvement of immune cells and uptake and metabolism of amino acids in females versus the development and function of vascular system, and uptake and metabolism of glucose and fatty acids in males [15]. In this study, 11 genes displayed sexual dimorphism regardless of diet (control or HFD). Consistent with the key role of genes on the sex chromosomes, three of these genes were Y-specific, *Ddx3y*, *Eif2s3y*, and *Kdm5d* (*Jarid1d*), and were more expressed in males, and three were X-specific, *Eif2s3x*, *Kdm5c* (*Jarid1c*), and *Ogt* and were more expressed in females. Interestingly, among these six X- and Y-linked genes, there were two paralogue pairs: *Eif2s3x/y* and *Kdm5c/5d* [10,15]. Of particular interest are the X-linked genes that encode enzymes of the epigenetic machinery and transcription factors: *Kmt1a* (*Suv39h1*), *Jpx*, *Xist*, *Kdm6b* (*Jmjd3*), *Kdm5c*, *Eif2s3x*, *Kdm6a* (*Utx*), and *Ddx3x*, as well as the corresponding paralogues for the latter ones, *Kdm5d*, *Eif2s3y*, *Uty*, and *Ddx3y* that are on the Y chromosome. Sex-specific differences in expression of the histone demethylases *Utx/Uty* and *Kdm5c* have been observed in mouse brain and neurons [117,118]. Other studies have reported the male-specific expression of Y-linked genes—*Ddx3y*, *Eif2s3y*, and *Kdm5d*—in mouse hearts and human myocardium [119] (Figure 4).

In mouse brain, Reinius and coworkers recently identified four female-biased long noncoding RNAs (lncRNAs) associated with protein-coding genes that escape X inactivation, the *Ddx3x/Kdm6a* cluster, *Eif2s3x*, *2610029G223Rik*, and *Kdm5c* [91]. Given that placenta, brain, and testis could share common mechanisms involving X-linked genes [120], these lncRNAs might also be implicated in placental development or function. Moreover, these mouse escapees from X inactivation also have a paralogue on the Y chromosome. According to the authors, these lncRNAs might also escape X inactivation [91]. It would thus be interesting to investigate how

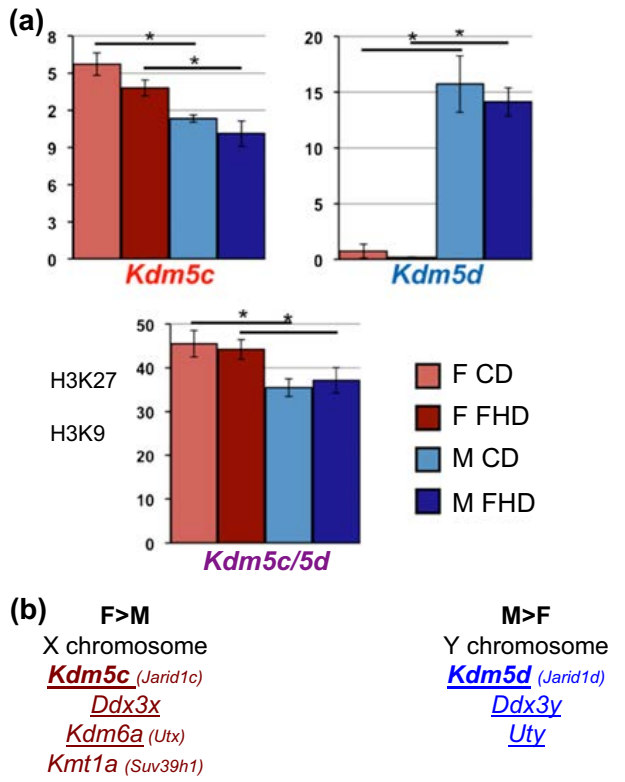


FIGURE 4 **Analysis of the mRNA expression of the *Kdm5c* and *Kdm5d* paralogues.** Three PCR primer pairs have been designed for recognizing specifically either *Kdm5c* or *Kdm5d* cDNA and for recognizing both *Kdm5c/5d* cDNA. Their expression was studied in male and female placentas in pregnant female mice fed either a control diet (CD) or a high-fat diet (HFD) from E0.5 to sacrifice at E15.5 stage: (a) in whole placentas, *Kdm5c* expression is higher in females (pink bars) than males (blue bars), and *Kdm5d* is expressed only in males, regardless of maternal diet. The *Kdm5c/5d* PCR shows that the combined expression of *Kdm5d* and *Kdm5c* expression in males is not of equivalent magnitude as the expression of *Kdm5c* from both alleles in females. *(From Ref. [10].)* (b) The expression of Y-linked with paralogues on the X chromosome: *Eif2s3x*, *Kdm5d*, *Ddx3y* sexually dimorphic genes in the heart of mice and human [119] was also sexually dimorphic in placenta layers.

these three mechanisms (escaping X inactivation, X/Y paralogues, and lncRNA) participate in sexual dimorphism.

The proteins encoded by Y-linked genes may or may not have the same functions, the same target sequences, or the same pattern of expression, according to age or tissue, as their X paralogue. *Kdm5c* and *Kdm5d* show 85% nucleotide identity and 87% amino acid identity that could account for differences in sex-, tissue-, and/or stage-specific gene expression, substrates, and targets [87]. Thus, the epigenetic enzymes produced by these two genes could mark the epigenome in a sex-specific manner, both at the quantitive and qualitative levels [121] leading to differences between the sexes in their writing, erasing, and reading their epigenome. In our study, in placenta of HFD-fed mouse mothers, the Y- and X-linked histone demethylase paralogue genes *Kdm5c* and *Kdm5d* were sexually dimorphic. In another report, in mouse brain, expression of the Y version of the gene in male mice did not compensate for the dosage imbalance between the two sexes in the expression of their X homologues escaping X inactivation. Figure 4 shows that, in placentas from mothers fed a control or HFD, the Y-linked *Kdm5d* gene expression in males is not able to compensate the expression of *Kdm5c*, its X-linked paralogue escaping XIC, in females [10,15].

In sex-biased diseases, it could be postulated that changes in the sex-specific epigenetic landscape could change the risk or resilience of one sex versus the other [122,123]. Thus, understanding the spatiotemporal [124] ontogeny, the windows of susceptibility, the dynamics, and environmental susceptibility of these marks could provide cues for the identification of the genes involved and new markers for diagnostic/prognosis [10,107,124].

THE SPECIFIC EPIGENETIC FEATURES OF EXTRAEMBRYONIC TISSUES AND PLACENTA

The DOHaD concept is consistent with the possibility that environmental influences can affect the development of sex differences early in development and in particular in the placenta, sculpting its epigenomes, and hence the epigenomes of the developing fetus [125].

The sex of the embryo affects the size of both the fetus and the placenta, and the ability of the placenta to respond to adverse stimuli [10]. But where, how, and when sex differences begin in the placenta and how they contribute to sex-specific responses of somatic tissues later in life is still poorly understood [10,75,126,127]. Female and male placentas have different routes to maximize fitness, and therefore the two sexes have different optimal transcriptomes that may affect fetal growth and later disease susceptibility or health trajectory [15]. Differences in how male and female placentas cope with stressful conditions indicate that this tissue should also be taken into account if we want to understand how it contributes to sexual dimorphism later in life [10]. The placenta may therefore be seen as an ideal system to study the sensing, by the fetus, of stresses, starvation, endocrine disruption, and obesity-prone diets or lifestyles, in a sex-specific manner [128,129].

Efforts are now being made to determine the contribution of epigenetics to the establishment and maintenance of sex differences. Most DOHaD studies have reported sex-specific transmission and/or effects, but very few have tackled the sex-specific epigenetic mechanisms involved, and especially in the placenta [10]. In a recent review, Novakovic and Saffery suggested that DNA methylation profiling highlights the unique nature of the human placental epigenome for genomic imprinting and placenta-specific gene-associated methylation. Placental cell types have a pattern of genome methylation that is significantly different from that in somatic tissues, with low methylation at some, but not all, repetitive elements (reviewed in Ref. [130]).

The Specific Features of the Placenta

The sex of the placenta and the environment have an influence on its epigenomes, and hence on the epigenomes of the developing fetus [131–133]. The epigenetic landscape required for placenta development has been described [134]. Sexually dimorphic patterns of gene expression have recently been reported for individual genes in placentas from humans and rodents, potentially accounting for differences in the sensitivity of male and female fetuses to maternal diet (reviewed in Refs [10,70]). Considering these expression studies, it is noteworthy that sex differences have been observed in the mRNA levels of housekeeping genes and of commonly used reference genes in human placenta, in a variety of mouse somatic and extraembryonic tissues, as well as in the preimplantation blastocyst and blastocyst-derived embryonic stem cells [135,136]. Although this is not surprising given the importance of sexual dimorphism in every tissue examined so far, it underlines the difficulty in choosing appropriate reference genes. Few groups have studied global sexual dimorphism in the placenta with microarrays, focusing in particular on the impact of maternal diet, asthma, or stress on placental gene expression, through systemic investigations of the relationship between diet and the expression of sexually dimorphic genes. These transcriptomic analyses showed that basal gene expression levels were sexually dimorphic in whole placentas [15,127,137]. Even fewer studies have investigated the diet-associated epigenetic changes [15,76].

The incomplete, and unstable, imprinted inactivation of the paternally inherited X-chromosome is observed in certain eutherians (e.g., rodents) at preimplantation stages of embryonic development and is retained in the extraembryonic organs that derive from the fetus. Therefore, in mice, the paternal X chromosome is inactivated in the placenta [95]. In the cells that form the tissues of the embryo proper, the paternal X chromosome is reactivated during implantation followed by a random inactivation of either the paternal or maternal X chromosome [84]. The paternal imprint in the blastocyst trophectoderm and their derivates such as placenta seems to be unique to mice, not occurring in rabbits, bovines, or humans where XCI occurs after the blastocyst stage [78].

In the mouse, detailed studies on sex chromosomal contribution to placental growth have been reported [138]. The X chromosome has been implicated in causing several malformations of the placenta. About 30% of all trophoblast-expressed genes are on the X chromosome, and alterations in many different X-linked genes could account for similar phenotypes [139,140]. Due to paternal X inactivation in trophoblast cells, mutations in these X-linked genes manifest themselves in embryonic lethality upon maternal transmission of the mutant allele in the mouse. A role for the Y chromosome in placental dysplasia has also been demonstrated [141]. It is also well established that male fetuses have a higher rate of perinatal complications attributed to placental dysfunction that may relate to the abundance of X-linked genes involved in placentogenesis [142].

Sex Differences: Sex Hormones and/or Sex Chromosomes?

Data from spotted hyena showed that the reduced expression of placental aromatase may allow the hyena placenta to convert high-circulating concentrations of androstenedione to testosterone and could explain the virilization of the fetal external genitalia in female fetuses [143]. However, current data highlight a sexually dimorphic difference in placental function that may not be conferred by classical assumptions of sex steroid regulation. Testosterone may act in a sex-specific manner in the human placenta and may be more potent in female placentas than males; however, further investigations into the role of testosterone in placental function are required [75]. Nonetheless, unequal gene expression by the sex chromosomes has an impact much earlier, beginning at conception, and may set the context for events in later life (reviewed in Refs [10,70,71,75,144]).

There are sex-specific alterations in placental gene expression in the presence of maternal asthma that may contribute to the sexually dimorphic difference in fetal growth in response to maternal asthma. Chronic maternal asthma is associated with reduced growth of the female fetus and normal growth of the male fetus [145]. Understanding the natural basic embryo sexual dimorphism for programming trajectories will help understanding of the early mechanisms of response to environmental insults [146].

DIFFERENCES BETWEEN MALE/FEMALE GAMETOGENESIS

Even before Conception for the Future Father and the Mother

Any differentiated cell type originates after a variable number of divisions from a stem cell, thus defining sensitive windows and their boundaries, during the reproductive phase is a delicate task. Thus, the impact of the environment may have occurred both on the epigenome of a toti or pluripotent stem cell, as on the epigenome of intermediate-type cells during gametogenesis and have been preserved in a different form during the differentiation process that extends from the migration of primordial geminal cells. A recent report suggests that RNA isolated from sperm may inform the offspring of the history of early trauma in the life of a father [61]. It is therefore not surprising that preconception impacts that can go back to a few decades before conception may have an influence [12,22,34,147]. This is probably why studies of males, free of these confounding factors, although fewer in number, have been more successful [74,148–151]—especially since in the mother the effects of different types of stress, nutritional, psychoaffective, toxic, or metabolic disorders (obesity, diabetes) during pregnancy represent confounding factors that are difficult to separate from effects transmitted only through the gametes.

Differences in timing, function, gene expression, and epigenetic plasticity and dynamics between male and female gametogenesis foreshadow differences in the modes of transfer and type of information that can be transmitted to the next generation(s). Moreover, after fertilization and during the preimplantation period, the

paternal and maternal genome still exhibit differences in erasure of epigenetic marks and reprogramming. The asymmetry between the paternal and maternal genome therefore suggests that exposure to certain environments may affect the germ line of the father or mother (or both), all their somatic tissues, and their reproductive systems, including the genital tract and environment

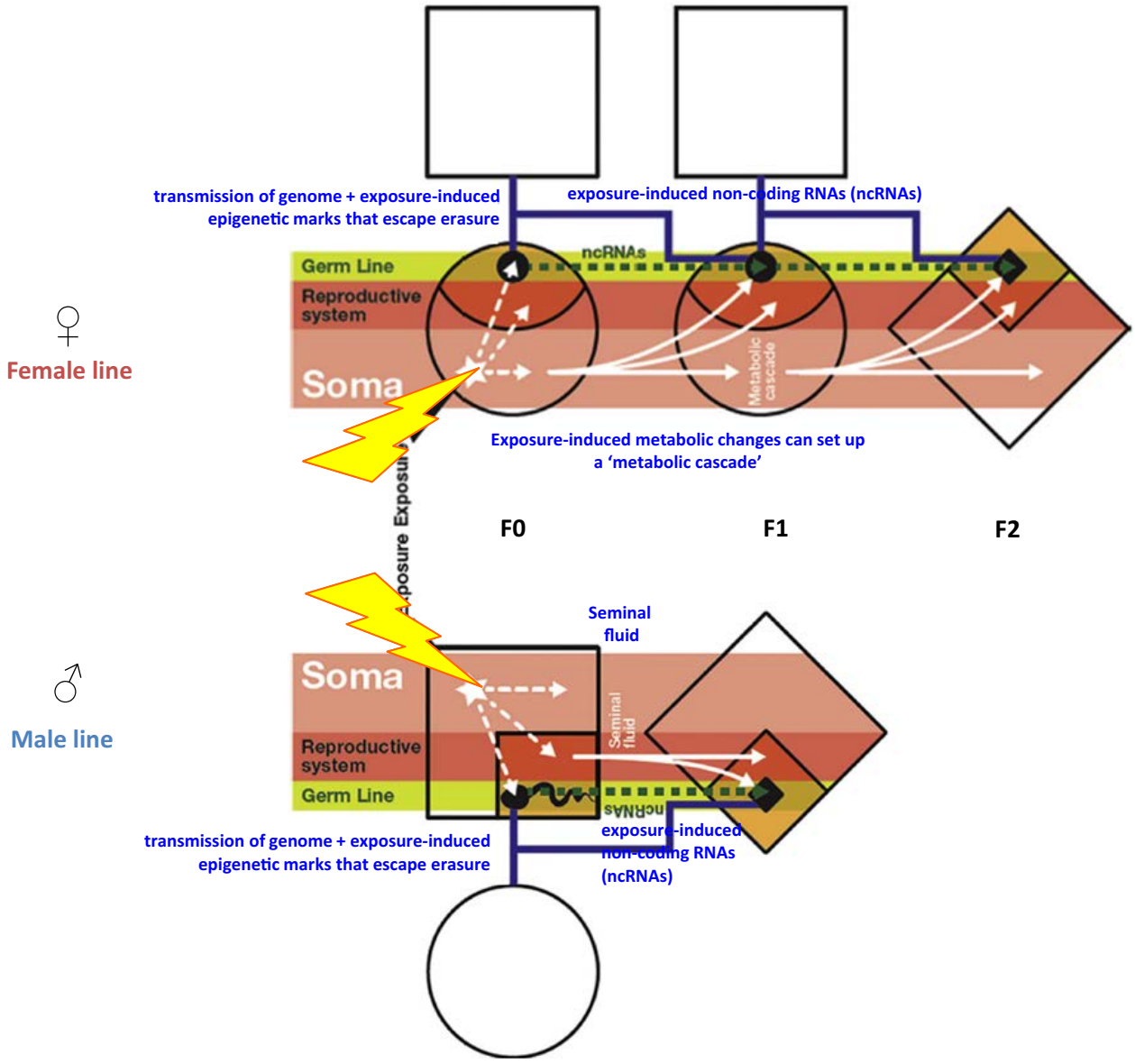


FIGURE 5 **Schematic pedigree diagram showing the main routes for the biological transmission of the effects of exposure to the subsequent generations.** Top, female line; Below, male line. The exposure can potentially affect the germ line, the reproductive system, and the somatic tissues. The traditional pedigree lines (blue) show chromosomal transmission, with the possibility of exposure-induced epigenetic marks that escape erasure and affect the development of the offspring. The germ line can potentially transmit exposure-induced noncoding RNAs (ncRNAs) that influence offspring development. Exposure-induced metabolic changes can set up a "metabolic cascade," such that changes in the reproductive tract influence early embryonic programming of the offspring or change metabolic signals across the placenta. An additional maternal route of transmission is the influence of the mother's microbiome on that of her child. *From Ref. [12].*

(Figure 5). This results in a complex dialogue between these systems that may lead to concerted transfer to subsequent generations [12,34,65,152].

The germ line and gametes display genetic (XX or XY), ontogenetic, morphological, and functional differences between the sexes. The nongenetic differences result from epigenetic asymmetry, which may persist after fertilization [153,154]. At conception, the gametes deliver the genetic heritage, DNA, which forms the genome of the embryo. They also transmit the different epigenomes and RNA molecules from both the father and mother, and mitochondria and a number of proteins from the mother only. Thus, in addition to the genetic heritage of the embryo, the parents also provide epigenetic, protein-based, and metabolic information relating to exposure to environmental factors, experience, physiopathological state, age, social class, parental education, and birth rank and weight [19,148] (Figure 5).

Given the criticality of maternal dietary behavior around the time of conception on long-term offspring health, in a sex-specific manner [155], the respective roles of the genome-wide parental epigenetic asymmetries inherited from the sperm and the oocyte represent important targets to unravel parts of the sexual dimorphism conundrum [154]. Little is known, however, about the impact and long-term effects of these asymmetric factors, their evolution (erasure or maintenance), and the ontogeny of tissue-specific expression according to the sex of the embryo. The few examples concerning smoking and obesity, in human epidemiology and in animal models, suggest that this is an important yet unexplored route for understanding sex-specific vulnerability or resilience [12,156,157].

Because the oocyte and the sperm harbor vastly different types of chromatin and carry different sets of RNA populations (Bourc'his and Voinnet, 2010 [233]; Gill, Erkek, and Peters [188]), the potential for additional parental asymmetry in the early embryo is tremendous [154,158]. A survey of parental epigenetic asymmetries in mammals, organized in a developmental time frame, from their establishment in gametes, to their selective consolidation or erasure immediately after fertilization, to their further restriction during embryonic development was recently provided [154]. The differences in hormonal, temporal, structural, and functional control of germ cell development shape gametic epigenomes in a highly sexually dimorphic manner (Figure 6).

During spermiogenesis canonical histones are largely replaced by protamines, small basic molecules that allow the formation of DNA structures more closely compacted and important for normal sperm function [159]. However, recent studies suggest that all histones organized in nucleosomes are not replaced. Thus the resistance to reprogramming is more widespread. About 10% of histones are retained in humans, compared to only 1% in mice. The idea that prevails today is that nucleosomes not replaced by protamines are located primarily at the level of genes important for development [160] at regulatory sequences, but were also found at repeated blocks poor in genes [161]. A set of criteria including the composition of the DNA sequence, the non-CpG island methylation of CpG-rich at the promoter, the dynamic replacement of canonical histones with histone variants and H3K27me3 mark suggests a structure may be involved in the intergenerational transmission of epigenetic information, contributing to the regulation of gene expression in offspring [162]. The same systematic study on human and mouse sperm shows a conservation in the evolution of the basic principles of the retention of nucleosomes that might be a case for their role in epigenetic inheritance between generations [162].

Moreover, Lesch et al. have demonstrated that a set of genes critical for the early and later development is maintained in an ambiguous state epigenetically (poised) from embryonic stages until the end of the meiosis characterized by the presence of divalent and lacking expression marks, as in ES cells. These data suggest that this condition (poised) for these development genes is a

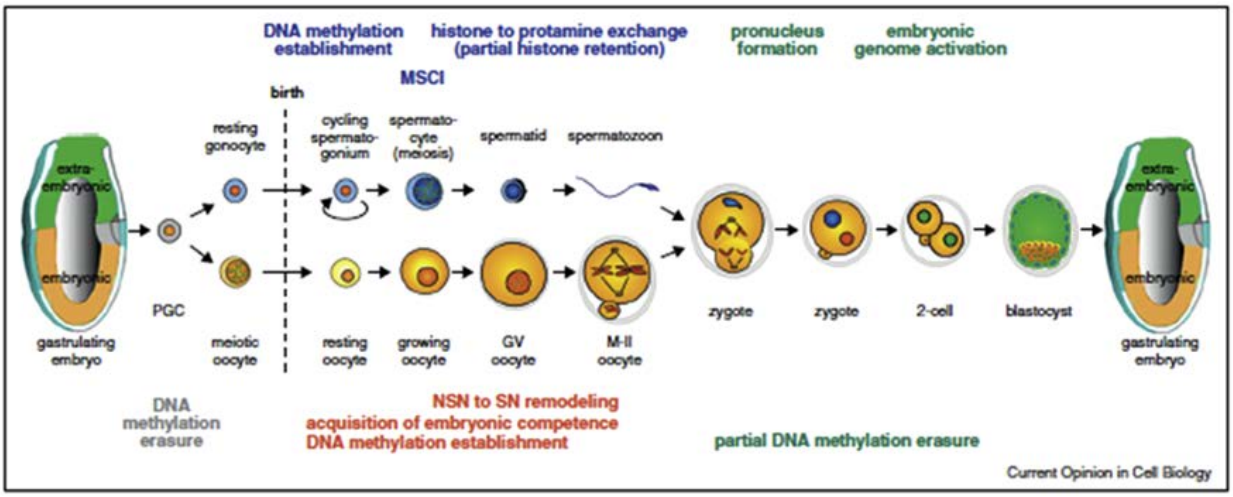


FIGURE 6 **Life cycle of mammalian gametogenesis and embryogenesis.** Primordial germ cells (PGCs) arise from proximal epiblast cells. They undergo extensive erasure of DNA methylation and chromatin changes during migration to and entry into the gonad. Directed by the somatic gonadal environment, germ cells are destined for a male or female fate. Male germ cells, initially called gonocytes, have arrested cell cycles and they begin to establish male-specific DNA methylation patterns. During the subsequent meiotic prophase, the X and Y chromosomes undergo meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) characterized by major chromatin remodeling events. Following meiotic divisions, haploid spermatids undergo extensive nuclear and morphological changes, including an almost genome-wide replacement of histones with protamines. However, nucleosomes are retained on regulatory sequences, providing a potential means of epigenetic inheritance. Female germ cells enter meiotic prophase in the embryo and complete their meiotic divisions upon hormonal induction in the adult ovary and fertilization by sperm. During the growing phase, oocytes establish DNA methylation at genes and imprinting control regions, undergo chromatin remodeling, and acquire competence for the direction of embryogenesis. Upon fertilization, the parental genomes form two pronuclei that are epigenetically different, reflecting the history of parental germ line-specific chromatin remodeling events. The paternal and maternal genomes undergo active and passive erasure of DNA methylation. The asymmetry of the chromatin states of paternal and maternal chromosomes may potentially regulate the activation and repression of de novo gene expression in preimplantation embryos, thereby directing embryogenesis. A latent epigenetic state, characterized by the presence of H3K4me3 and H3K27me3 bivalent marks in the promoters of genes involved in development, not expressed at these stages, is a fundamental property of the nucleus of mammalian germ line cells, enabling differentiated gametes to initiate a totipotency program immediately after fertilization [89]. *From Ref. [188].*

fundamental property of the nucleus of the germ line of mammals, giving the gametes differentiated the ability to "unleash" without waiting a totipotence program just after fertilization [89]. These data were demonstrated for the female to the initiation stage of meiosis, and for the male to the stage of meiotic germ cells and post meiotic in humans and mouse [151,160,163]. However, probably for technical reasons potentially linked to the composition of histone variants, the various studies performed did not identify the same types of sequence. The nucleosomes identified were located principally at genes critical for early or late development [160], and at regulatory sequences, but some were also found at repeated sequences containing few genes [164]. Nonetheless, these sequences are potential candidates for epigenetic heredity.

DIFFERENCES IN REPROGRAMMING OF MATERNAL/PATERNAL GENOME

Environmental and Metabolic Programming from Fertilization to Preimplantation

Environmental and metabolic programming occurs as early as during the first hours/days in ontogeny during embryo preimplantation development. It has been shown that both environmental and metabolic factors influence not only immediate events of blastocyst morphogenesis but also the fetal and postnatal phenotype, including behavior, cardiovascular function, and reproductive function in several species, including sheep [73,165–176]. In mice, maternal high- and low-protein diets reduce the number of inner cell mass (ICM) cells, lower the mitochondrial membrane potential, and elevate reactive oxygen species levels in blastocysts [177]. Kwong and coworkers [173] showed that feeding a low-protein diet to pregnant rats during the preimplantation period (0–4.25 days after mating) was sufficient to disturb subsequent embryo development. Blastocysts showed significantly reduced cell numbers, first within the ICM and later within both blastocyst cell lineages (ICM/embryoblast and trophectoderm/trophoblast). These changes, induced by a slower rate of cellular proliferation and not by increased apoptosis, were subsequently followed by sex-dependent long-term effects such as excess growth and hypertension in adulthood [73,165,166,173]. Similarly, protein deprivation during in vitro culture [165] led to altered growth and hypertension in offspring and/or altered expression of metabolic regulatory enzymes.

In mice, Watkins and coworkers [165] showed that embryo culture from the two-cell to the blastocyst stage in medium supplemented or not with a protein source induced reduced trophectoderm and ICM cell numbers compared with in vivo–produced embryos. Embryo culture also led to an enhanced systolic blood pressure in adults, together with increased activity of enzymatic regulators of cardiovascular and metabolic physiology, serum angiotensin converting enzyme, and the gluconeogenetic key enzyme, hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase. In rabbits, our group has shown that gene expression in the embryo is altered according to the embryo culture medium used [178]. Gastrulation, that is, the formation and differentiation of the three germ layers, is a crucial switch point in ontogeny with far-reaching consequences for pre- and postnatal development of all cells, tissues, and organs. In ruminants, in vitro culture has been associated with the "large offspring syndrome," a condition of enhanced fetal growth, large birth weight, and a higher incidence of perinatal mortality (see Ref. [179] for review). It has recently been shown that in vitro culture conditions, as found in assisted reproduction technology for humans, may affect global patterns of DNA methylation and gene expression. Katari et al. highlighted the association between in vitro conception and changes in DNA methylation, potentially affecting the long-term pattern of expression of genes involved in chronic metabolic disorders, such as obesity and T2D [180]. Identifying the specific features and functions of the epigenetic buildup at these stages and determining the mechanistic pathways by which environmental factors may affect them in the long term will be a major milestone in the domain of DOHaD investigation [181,182].

The Various Phases of Reprogramming and the Twists of Mark Erasure

Two principal phases of reprogramming (comprising erasure—reestablishment—and maintenance of marks) have been studied; the first occurs in the zygote, just after fertilization, and the others occur in the germ line, when the primordial germ cells migrate toward the genital ridges before sexual differentiation [183] (Figure 7). It was commonly agreed that, apart from the imprinted genes, methylation of genes

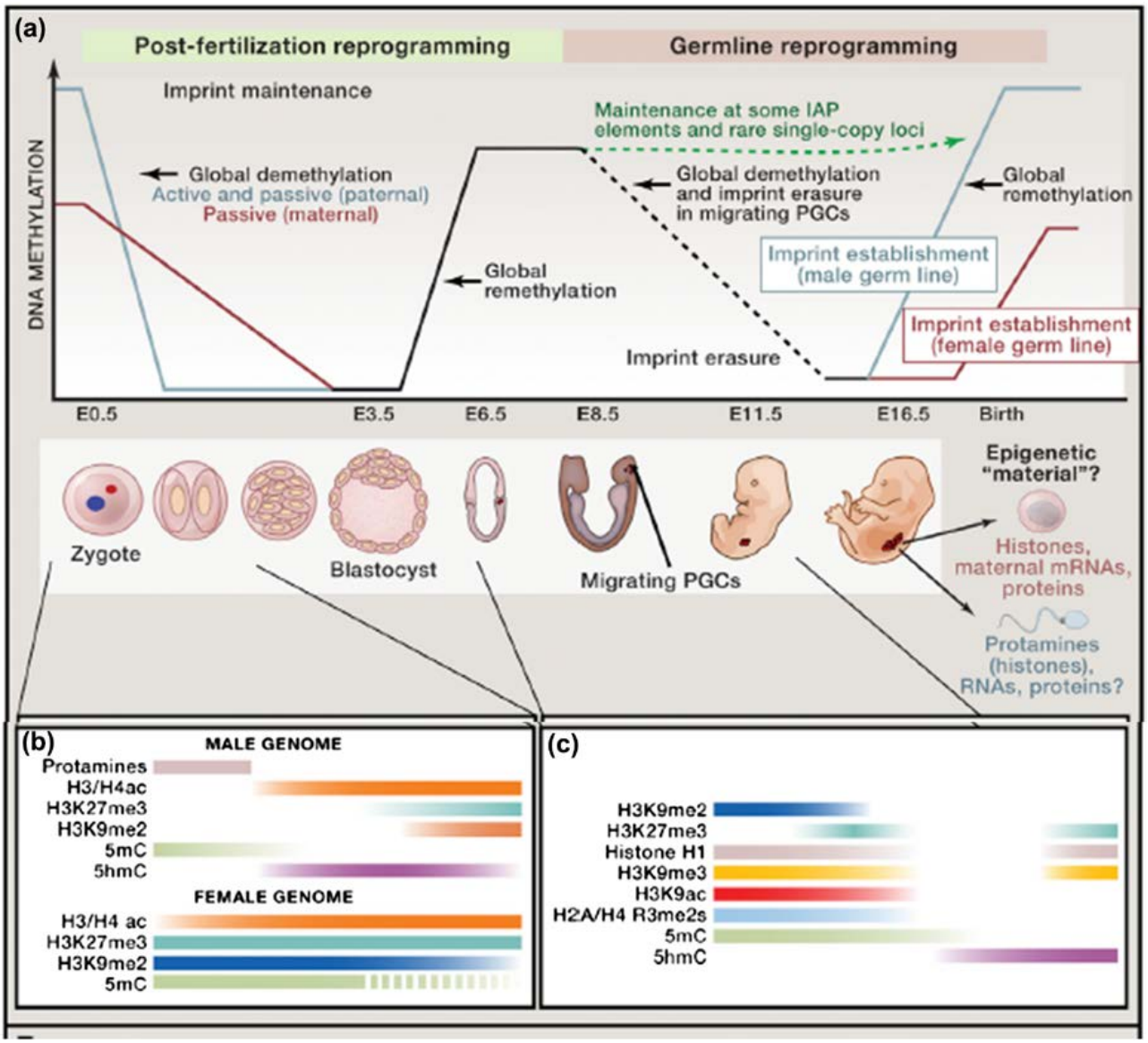


FIGURE 7 **Epigenetic changes during in vivo reprogramming.** (a) DNA methylation dynamics during developmental reprogramming. After fertilization, the paternal genome (blue line) is rapidly demethylated by active mechanisms, whereas the maternal genome (red line) is passively demethylated. Differentially methylated regions (DMRs) associated with imprinted genes are protected from this erasure (dashed green line). De novo methylation occurs after implantation (black line), but primordial germ cells (PGCs) are not specified until the epiblast stage (shading at the top of the figure). This methylation must be reset in PGCs. The figure shows the methylation dynamics, from E6.5, of the cells forming the germ line only. Most sequences are demethylated by E9.5 in PGCs. Some sequences are subject to late demethylation and are not reprogrammed until after PGC migration. These sequences include, but are not limited to, the imprinted DMRs. Intracisternal A particles (IAPs) are resistant to demethylation during both the postfertilization and PGC waves of reprogramming. Variably erased CG islands (VECs) can resist erasure during PGC reprogramming, but their methylation status during postfertilization reprogramming is unclear. Following sex determination, the germ cells undergo de novo methylation, but the dynamics are sex specific. Methylation is completed in the prospermatogonia before birth, whereas methylation in the oocytes is established during postnatal growth. In adulthood, the gametes are appropriately methylated to form a new zygote and to restart the cycle of methylation dynamics. We show below the developmental windows investigated in three key studies, with the specific time points analyzed indicated. blast., blastocyst; d5, day 5 oocytes; GV, germinal vesicle oocytes, MII, metaphase II oocytes. *(From Ref. [183].)* (b) Epigenetic changes during in vivo reprogramming. Schematic diagram of the global DNA and histone modifications leading to transcriptional activation of the embryonic genome between the late zygote (paternal genome only) and the two-cell stage. Gamete genomes undergo different epigenetic programs after fertilization, with the paternal genome mostly subject to epigenetic remodeling at the zygote stage and the maternal genome gradually losing repressive modifications during subsequent cleavages. (c) Global epigenetic changes during germ line development from PGC specification (E6.5) to mitotic/meiotic arrest at E13.5. Two major reprogramming phases can be distinguished during PGC migration toward the genital ridges (E7.5–E10.5) and upon their arrival in the gonads (E10.5–E12.5). *(From Ref. [232].)*

associated with the male germ line was largely erased in the zygote [184]. Incomplete erasing of parental epigenetic marks, DNA methylation and histone marks, could therefore result in a transgenerational inheritance of epigenetic marks left by the environment [185].

However, the histone marks and methylation patterns of certain DNA sequences may not be erased [185]. Two other phases may also be considered as reprogramming processes: as already mentioned during gametogenesis the final compaction of the chromatin of the spermatozoa, linked to the replacement of a large proportion of the histones by protamines (Figure 7(b)), and the massive changes, particularly during the reorganization of the brain and its maturation during puberty. This last phase of reprogramming has only started to be studied in detail at the epigenomic level (reviewed in Ref. [186]).

One of these phases, involving the erasure of specific epigenetic marks from the gametes, leads to the acquisition of a totipotent epigenome, allowing the cells of the embryo to differentiate into any type of cell. Several key transcription factors as well as posttranslational histone modifications and ATP-dependent chromatin remodeling complexes converge with these transcriptional networks to regulate the development of a totipotent zygote into a multilineage blastocyst. The first cell-fate decision is the segregation of the ICM and trophectoderm cell lineages [187](Figure 7(b)). Some sequences, such as those of genes subject to parental imprinting, escape this process. Following another phase of reprogramming linked to the germ line, the remethylation of DNA occurring after sex determination facilitates the acquisition of a very specific expression program, including imprinted genes, for gamete differentiation (Figure 7(c)). Given the epigenetic asymmetry of the gametes of the father and the mother, sensitive unerased marks may differ between chromosomes of paternal and maternal origin in the zygote. The mechanisms involved have yet to be determined, but these observations suggest that the possibilities for transmission of environmental information may differ as a function of the sex of the transmitting parent [188] (Figure 6).

The incomplete erasure of some parental epigenetic marks—DNA methylation and histone marks—and the polycomb and trithorax systems make possible the programming and transgenerational transmission of environmental impacts [184,185]. These regions are thus ideal candidates for the transfer of environmental exposure information. Depending on the chromosome concerned, and particularly if the X and Y chromosomes display such differences, could these regions account for the differences in the effects on female and male offspring? The principal problem here is that the epigenetic mechanisms involved are dynamic and change rapidly with environmental variation. They are also based on multiple strata of partially redundant pathways, which may be synergic, inhibitory, or activating, depending on the context [189,190]. Thus, if the impact of the exposure of the future parents to environmental factors several years before conception affects precisely this type of sequence [12,22,34,147], then these sequences may be responsible for the transgenerational responses observed in the descendants.

In another study, the authors sought to identify the genomic targets of remethylation after implantation in mice. While it was commonly believed that only the imprinted genes escaped the process of postfertilization demethylation, they demonstrated that other genes (not imprinted) could carry on the parental gamete methylation pattern in their promoter. Escaping the erasure of post-fertilization methylation is more prevalent than generally accepted in the mouse genome [191]. Certain genes, particularly genes expressed in the germ line but also genes of somatic tissues, are resistant to the overall demethylation after fertilization and inherit the parental gametes methylation at their promoter. So far, through the genes tested, these data indicate that the transmission of DNA methylation

after fertilization comes from the oocyte [191]. In humans, very recent studies show that as in mice the number of methylated sites is much more important than in the sperm into the oocyte [192,193]. An extended but site-specific active and passive demethylation occurs in the male pronucleus and in the female pronucleus isolated at stages PN3-PN4 [192,193].

For repeated sequences, the best known example, in mice, is that of IAP sequences (intracisternal A particle retrotransposon), involved in the transmission of methylated states that interfere with the expression of several loci including the two loci, viable yellow agouti, A^{vy}, and Axin-Fused, AxinFu. These sequences are resistant to postfertilization demethylation [194]. In humans, a single locus shows a similar phenomenon [28].

It is now well established that environmental exposures during any window during the life of a female or a male can induce different phenotypes in offspring. All these studies show that we are beginning to know the genes and sequences that could explain differences in transmission between a male and a female. Yet there is very little research focusing on the effects of the environment on these processes to understand how the memory of these events can be transmitted, what are the supports mediating this information? The preservation of certain mechanisms between human and mouse opens up interesting avenues of investigation.

Mysterious Intermediaries Passing on the Message from Generation to Generation

At fertilization, in both humans and mice, there are many more methylated sites in the spermatozoa than in the oocyte [193]. There is extensive, but site-specific demethylation in the male and female pronuclei after fertilization. This process involves both active and passive mechanisms, depending on the parental origin of the chromosome [193]. It is widely accepted that only imprinted genes escape this process of demethylation. However, one recent study showed that other genes are also resistant [195]. In this mouse model of undernutrition in the grandmother (F0), the spermatozoa of the father (F1) display a disturbance of the methylome in differentially methylated regions (DMRs), with effects on the metabolism of his descendants (F2) [195]. Interestingly, 43% of the DMRs hypomethylated in the F1 were also hypomethylated in the F2 generation and therefore had the potential to affect the development of this subsequent generation. Many of the genes affected are expressed in the germ line, but some are also expressed in somatic tissues. However, although this differential methylation was lost from the F2 generation by the end of gestation, major differences persisted in the expression of genes involved in metabolism located close to these DMRs. It therefore seems unlikely that these changes in expression are directly controlled by DNA methylation [195]. A similar process has been reported for the repercussions in the second generation of the effects of diet-induced maternal obesity [196].

These examples show that epigenetic profiles deregulated early in development are capable of passing the torch to other entities, thereby inducing other, as yet unidentified changes that might affect chromatin architecture, networks of transcription factors, or the differentiation or structure of tissues. In the model of resistance to cocaine addiction, the same modification (histone acetylation) to the same gene (*Bdnf*) was observed in the spermatozoa of the father and in the prefrontal cortex of his resistant male progeny [59]. As histone acetylation is a mark associated with expression, this observation cannot be seen as proof that this is the mechanism responsible for information transfer.

The two examples cited above only appear to be contradictory; they do not in any way exclude the possible involvement of an epigenetic process. The pertinent epigenetic marks involved have probably either not been studied or have not been studied at the appropriate stage.

Given the dialogue known to occur between marks, we would expect more than one type of mark to be involved, together with other, non-epigenetic processes. Are these associations the cause or a consequence of the dynamics of these marks? The key question to be addressed here remains that of the true causal link between epigenetic marks and the observed phenotypes.

Noncoding RNAs

During fertilization, the spermatozoid not only provides the paternal haploid genome but it also releases 24,000 noncoding RNAs (ncRNAs: siRNA, piRNA, and miRNA…) into the oocyte. Sperm RNA has been shown to transmit acquired characters in rodents. In particular, the use of sperm from maltreated animals has been shown to reproduce metabolic or behavioral changes in the descendants similar to those observed in the father [25,30,61,197–201].

One recent report suggested that RNA isolated from sperm might provide the progeny with information about the history of precocious trauma (through maternal stress) in the life of the father, with the effects and responses persisting until the third generation [61]. However, once again, the absence of presumed causal epigenetic alteration suggests that the initial mark may be transposed to other marks or epigenetic complexes in a relay. The epigenetic modifications present in the sperm cells following exposure to maternal stress may thus be converted into other marks, which may or may not be epigenetic in nature, for subsequent transmission [202,203].

The involvement of ncRNA in transgenerational effects and responses was recently demonstrated in an invertebrate species lacking DNA methylation, *C. elegans* [31]. Exposure to viral particles led to the appearance of ncRNAs derived from the virus, which inhibited the expression of the viral genome, by RNA interference mechanisms, over several generations, thereby conferring a transmissible "immunity" [56]. A lack of food during the larval stage also leads to the appearance of microRNAs (miRNAs) targeting transcripts for proteins involved in nutrition and leading to an increase in the longevity of the third generation. These miRNAs cope with all eventualities, as some also target genes that are normally switched off but may be induced in response to stress [57].

Finally, seminal fluid can play different roles and in particular can warn the mother of previous exposure of the father (infection) and affect anxiety, body composition, and metabolic phenotype of the offspring [65]. The oviductal fluid surrounding the embryo varies according to maternal nutrition, metabolic status, and inflammatory parameters, providing a microcosm that reflects the outside world [34].

A comprehensive understanding of all the mechanisms that compromise sex-specific fetal programming will eventually allow a shift from understanding how DOHaD leads to disease to improved methods for avoiding such factors during sex-specific critical windows and to reinforce choices that favor prevention and alleviation of diseases with a DOHaD basis in a sex/gender perspective. Beyond epigenetics stricto sensu, it is the whole set of systems biology that can help to explore the mechanisms involved in the nongenetic transfer of information, memory exhibitions: metabolites, seminal liquid, prions, etc. These concepts compel us to revise the generally accepted ideas to make room for the idea that biological parenthood begins well before birth, even before conception [34].

Skip in Generation

As for genetic diseases, there may be a skip of generation in transmission. A recent study showed that undernutrition in utero disrupts the male methylome and is associated with effects on the intergenerational metabolism associated with DMRs that escape reprogramming [195]. Indeed, according to a Radford et al. study, 43% of DMRs persist and thus the potential to

affect the development of the next generation. Yet although the differential methylation is lost in the F2 late in pregnancy, significant tissue-specific differences in the expression of genes involved in metabolism and in the vicinity of these DMRs persist. It is therefore unlikely that these expression changes are directly under the control of DNA methylation. More likely, the effects of epigenetic profiles deregulated earlier during development must be capable of triggering secondary alterations in chromatin architecture, in the regulatory networks of transcription, differentiation, and tissue structure [195].

A similar process was observed in the impact of the effects of maternal obesity induced by diet, on the second generation [196]. In another model of maternal stress [61], there is also a persistence of the effects on the F3. But again, the absence of the alleged causal epigenetic alteration, noncoding RNAs, observed at the previous generation, suggests a transposition of the initial marking to other epigenetic marks or other substrate. It is thus possible that epigenetic changes that occurred in the sperm cells, following exposure to maternal stress, were transferred to other supports, epigenetic or not, such as DNA methylation or MPT histone for maintenance and subsequent transmission [202,203]. Similarly, in humans, access to abundant or restricted food for paternal grandfathers (F0) during childhood result in variations in the risk of diabetes or longevity in the grandson (F2) without apparent effects for the father (F1) [5].

Persistence?

When, how, who can transmit some "acquired characteristics" or "souvenirs" and for how many generations? The number of generations studied depends on the model and generation time. Humans studies generally do not exceed two generations and therefore correspond to intergenerational, not transgenerational effects [5,12,22,204–206].

In contrast, in rodents, there is one model of glucose intolerance by overnutrition over more than 12 generations, but most studies proceed to the F2 and, much more rarely, to the F3 or F4 [6,7,41,207–213]. However, for animals with much shorter generation time as the nematode *C. elegans* [27,56], or *Drosophila*, persistence is observed on several dozen generations. Nonetheless, there is no question of permanence, indeed chromatin was shown to preserve the ability to return to its initial state [214].

WHAT LEVELS OF EVIDENCE: THE LIMITING AND CONFOUNDERS FACTORS

There is still a lack of a unifying model concerning the involvement of epigenetics in inter/transgenerational effects. This easily explains the skepticism or controversy with respect to the precise roles of epigenetics. The most commonly cited example of epigenetic transmission concerns the effect of maternal diet during pregnancy on the coat color in mice Agouti AVY (Viable yellow) [215,216], but is not strictly speaking Lamarckian. Indeed, a change in coat color acquired during the life of the mother is somehow encoded in the germ cells and passed on to offspring. Moreover, the probable duration of these effects is incompatible with the timescale of evolution. The first explanation for this apparent ability of the genome of the offspring to be programmed in response to the maternal environment before birth is that it should be beneficial to the offspring already born with a metabolic response pattern most appropriate for the environment in which it is called to live. However, the most logical explanation is that since the genome should be reprogrammed each generation to optimize its response to the environment, this could rule out a multigenerational effect operating on timescales of evolution [217].

However, in another case—in utero undernutrition for the father—while changes in DNA

methylation or DMR were found for a large number of genes in the sperm, these DMR were not found in the offspring. Although in agreement with the observed phenotype, disruption of the expression of metabolic genes persisted. These two examples are contradictory only in appearance and in any case do not exclude the role of epigenetic process involving other marks or other superimposed nonepigenetic mechanisms.

Simply relevant epigenetic marks were probably not studied and at the appropriate stages. Given the number and the dialogues between marks, it would be surprising only one type of mark is involved. This issue was well explored by Kaufman and Rando, who in a recent review on the topic, make a critical analysis of some examples and indicate when a process other than epigenetic may be incriminated or when the facts are not as well established as one might think [218]. There are several ways to check the involvement of an epigenetic mechanism, easily achievable in an animal model, but much more difficult in humans. Ideally, before concluding to a nongenetic transgenerational effect, we should also proceed to (1) massive sequencing to assess the new mutation rate transmitted by maternal or paternal gametes or occurring at a very early stage. It is about 100 mutations per generation, but anyway some areas of the genome (DNA repeats) remain inaccessible with current sequencing methods or are difficult to highlight (duplications, deletions) to verify that no new mutation is causing the observed phenomenon and its persistence over several generations. (2) Massive sequencing to study variations in copy number of repeated elements (CNV) in the genome that could account for the phenotype observed in the offspring, and could be transmitted indefinitely as a new mutation. However, because of their repeated feature, it is not easy from a technical point of view. (3) An embryo transfer, which can separate the early effects related to the influence of the mother; (4) Cross-adoption, the pups being exchanged at birth. (5) In vitro fertilization to separate what is transmitted through semen, the effects due to the male behavior and its interactions with the female, which may lead to a change in the resources allocated by the mother to her young, as has been observed in rats [219] or for the Finch [220]. If the proof of concept does exist, there is a long way to go to have epigenetic markers validated [221], let alone reliable customized nutritional interventions in humans [222]. The main challenge for the individual and especially for the government is "how to avoid these transmissions?" This challenge remains open, but is not yet, apparently, on the agenda!

CONCLUSIONS

The influences of environmental factors on epigenetic processes have revolutionized our view of developmental plasticity and of transgenerational transmission of information on environmental impacts, but several key questions remain unanswered: How do differences linked to the sex of the parents impose sexual dimorphism on the progeny and, even, on subsequent generations? What is the true nature of the impact of environmental factors? What is the nature of the targets of these factors (marks and/or conformation)? What is the nature of the targets to which the information is transferred? How does the stored information persist over generations? What are the windows of sensitivity or insensitivity to these factors? [10,12,22,28,30].

Several critical issues remain to be addressed for unraveling the sexually dimorphic nature of programming in utero. We still know little about the mechanisms underlying the early sex-specific expression of genes and gene networks resulting from epigenetic regulation in every tissue, even cell types. Elucidation of the biological basis of differences in male and female development will improve our understanding of the respective contributions of hormones,

X- and Y-linked genes, autosomal genes, and their possible synergistic or antagonistic interactions [72,114,223]. Moreover, sexual dimorphism is not based just on different gene expression but also in levels and turnover of proteins, on metabolites, therefore requiring a systems biology approach that has not yet been developed [224]. An understanding of these factors and of the sex-specific genetic and epigenetic architecture of human disease might also reveal the existence of sex-specific protective mechanisms that could be exploited in novel treatments [225].

Nevertheless, the issue that remains to be solved is that of the true causal link between epigenetic marks undoubtedly "associated" with exposure and the phenotype observed and relevant marks observed in the offspring. Is this association, the real cause or a mere consequence of the dynamics of marks [226]? Thus, there is sometimes a same modification (histone acetylation) on the same gene in the father's sperm—exposed to cocaine—and in the prefrontal cortex, indeed a relevant tissue, for offspring who resist cocaine [59]. If the proof of concept does exist, there is a long way to go to have epigenetic markers validated [221] let alone reliable customized nutritional interventions in humans [222].

The genes and sequences escaping reprogramming and the mechanisms involved are beginning to be identified and are good candidates for involvement in transgenerational effects. Studies of the effects of the environment would make it possible to determine whether these sequences carry a memory of these effects or whether other sequences can gain the same capacity to resist mark erasure. By contrast, the processes, epigenetic or otherwise, by which the information is propagated are unknown, as are those underlying the differences in transmission from the father and the mother. Above all, very few studies have focused on the effects of the environment on these processes, to determine how the memory of events can be transmitted and to reveal the nature of the successive intermediary supports. Most reprogramming studies have been carried out in mice [183,227]. The conservation of certain mechanisms between species opens up interesting possibilities.

Thus, sexual dimorphism in gene expression exists in all tissues at any stage and can be perturbed by most environmental factors at a given stage. It makes sense to anticipate that comparing one sex (protected) with the other (susceptible) will provide new strategies to discover epigenetic mechanisms, genes, and pathways involved in disease etiology. In addition, reversal and recovery of sexual dimorphism in gene expression, which can be observed when comparing males and female patients, represent new avenues of investigations for diagnostic, prognostic, and treatment purposes [228,229]. Thus, sex reversal can unveil sequences/mechanisms involved in diseases. Moreover, explorations of changes in sexual dimorphism will be useful to end the underrepresentation of women/females for the development of different treatment strategies more precisely adapted to males and females.

The need to identify relevant sex-dependent epigenetic marks, to monitor their regulation during development and in response to various environmental stress, and to use them as potential markers of disease risk thus remains a major challenge. Given the tissue and stage specificity of sexual dimorphism, animal experiments are instrumental to unravel the role of epigenetic inheritance and noncoding RNAs, in terms of what lessons can be learned for designing and interpreting human studies. Given the sex differences in disease occurrence, severity, and resilience, and in response to different environmental factors, it is important to convince the scientific community working on experimenanimal models to take sex, generation into account and to look at both parents to study both sexes, to take into account resilience, skip in generation, and to study different traits, not just the initial effect, which altogether is far from being the case.

The striking sexual dimorphism for programming trajectories necessitates a considerable revision of current dietary intervention protocols. The identification of sex-specific explanations of the responses and adaptation of males and females to dietary quality, quantity, and other environmental factors should help physicians and patients anticipate the major challenges likely to occur during the patient's lifetime. In that context, placental analyses could be used to identify children at risk of adverse programming. If some characteristics are actually transmitted, the main challenge for the individual and especially for the government is "how to avoid these transmissions?" This challenge remains open, but is not yet, apparently, on the agenda!

Owing to the flexibility of epigenetic processes, the DOHaD and their underlying epigenetic mechanisms offer a new possibility to envisage a comprehensive and evidence-based plan of nutritional, behavioral, and socioeconomic recommendations to apply new cost-effective preventive actions against NCDs, in a sex-specific manner [32,230,231].

References

[1] Arnold AP. The end of gonad-centric sex determination in mammals. Trends Genet 2011;28(2):55–61.

[2] Heckman JJ. The developmental origins of health. Health Econ 2012;21(1):24–9.

[3] Barker DJP, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet 1986;327(8489):1077–81.

[4] Crews D, Gillette R, Scarpino SV, Manikkam M, Savenkova MI, Skinner MK. Epigenetic transgenerational inheritance of altered stress responses. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109(23):9143–8.

[5] Pembrey ME. Male-line transgenerational responses in humans. Hum Fertil (Camb) 2010;13(4):268–71.

[6] Nilsson E, Larsen G, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C, Savenkova MI, Skinner MK. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian disease. PLoS One 2012;7(5):e36129.

[7] Govorko D, Bekdash RA, Zhang C, Sarkar DK. Male germline transmits fetal alcohol adverse effect on hypothalamic proopiomelanocortin gene across generations. Biol Psychiatry 2012;72(5):378–88.

[8] Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjostrom M, et al. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. Eur J Hum Genet 2006;14(2):159–66.

[9] Koonin EV, Wolf YI. Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? Biol Direct 2009;4:42.

[10] Gabory A, Roseboom TJ, Moore T, Moore LG, Junien C. Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. Biol Sex Differ March 21, 2013;4(1):5.

[11] McCarrey JR. Distinctions between transgenerational and non-transgenerational epimutations. Mol Cell Endocrinol 2014;398(1-2):13–23.

[12] Pembrey M, Saffery R, Bygren LO. Human transgenerational responses to early-life experience: potential impact on development, health and biomedical research. J Med Genet 2014;51(9):563–72.

[13] Zeybel M, Hardy T, Wong YK, Mathers JC, Fox CR, Gackowska A, et al. Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. Nat Med 2012;18(9):1369–77.

[14] Attig L, Gabory A, Junien C. Early nutrition and epigenetic programming: chasing shadows. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2010;13(3):284–93.

[15] Gabory A, Ferry L, Fajardy I, Jouneau L, Gothie JD, Vige A, et al. Maternal diets trigger sex-specific divergent trajectories of gene expression and epigenetic systems in mouse placenta. PLoS One 2012;7(11):e47986.

[16] Sugathan A, Waxman DJ. Genome-wide analysis of chromatin states reveals distinct mechanisms of sex-dependent gene regulation in male and female mouse liver. Mol Cell Biol 2013;33(18):3594–610.

[17] Teh AL, Pan H, Chen L, Ong ML, Dogra S, Wong J, et al. The effect of genotype and in utero environment on interindividual variation in neonate DNA methylomes. Genome Res 2014;24(7):1064–74.

[18] Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. Nature 2014;509(7500):282–3.

[19] Curley JP, Mashoodh R, Champagne FA. Epigenetics and the origins of paternal effects. Horm Behav 2011;59(3):306–14.

[20] Morrow EH. The evolution of sex differences in disease. Biol Sex Differ 2015;6:5.

[21] Maklakov AA, Lummaa V. Evolution of sex differences in lifespan and aging: causes and constraints. Bioessays 2013;35(8):717–24.

[22] Grossniklaus U, Kelly WG, Ferguson-Smith AC, Pembrey M, Lindquist S. Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? Nat Rev Genet 2013;14(3):228–35.

[23] Sela M, Kloog Y, Rechavi O. Non-coding RNAs as the bridge between epigenetic mechanisms, lineages and domains of life. J Physiol 2014;592(Pt 11):2369–73.

[24] Cuzin F, Rassoulzadegan M. Non-Mendelian epigenetic heredity: gametic RNAs as epigenetic regulators and transgenerational signals. Essays Biochem 2010;48(1):101–6.
[25] Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. Nature 2006;441(7092):469–74.
[26] Somer RA, Thummel CS. Epigenetic inheritance of metabolic state. Curr Opin Genet Dev 2014;27C:43–7.
[27] Rechavi O, Houri-Ze'evi L, Anava S, Goh WS, Kerk SY, Hannon GJ, et al. Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. Cell 2014;158(2):277–87.
[28] Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. Cell 2014;157(1):95–109.
[29] Meaney MJ, Ferguson-Smith AC. Epigenetic regulation of the neural transcriptome: the meaning of the marks. Nat Neurosci 2010;13(11):1313–8.
[30] Daxinger L, Whitelaw E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. Nat Rev Genet 2012;13(3):153–62.
[31] Lim JP, Brunet A. Bridging the transgenerational gap with epigenetic memory. Trends Genet 2013;29(3):176–86.
[32] Ferguson-Smith AC, Patti ME. You are what your dad ate. Cell Metab 2011;13(2):115–7.
[33] Junien C, Gabory A, Attig L. Sexual dimorphism in the XXI(st) century. Med Sci (Paris) 2012;28(2):185–92.
[34] Lane M, Robker RL, Robertson SA. Parenting from before conception. Science 2014;345(6198):756–60.
[35] Dunn GA, Morgan CP, Bale TL. Sex-specificity in transgenerational epigenetic programming. Horm Behav 2010;59(3):290–5.
[36] Drake AJ, Walker BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. J Endocrinol 2004;180(1):1–16.
[37] Anderson LM, Riffle L, Wilson R, Travlos GS, Lubomirski MS, Alvord WG. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. Nutrition 2006;22(3):327–31.
[38] Attig L, Vige A, Gabory A, Karimi M, Beauger A, Gross MS, et al. Dietary alleviation of maternal obesity and diabetes: increased resistance to diet-induced obesity transcriptional and epigenetic signatures. PLoS One 2013;8(6):e66816.
[39] Delahaye F, Wijetunga NA, Heo HJ, Tozour JN, Zhao YM, Greally JM, et al. Sexual dimorphism in epigenomic responses of stem cells to extreme fetal growth. Nat Commun 2014;5:5187.
[40] Aiken CE, Ozanne SE. Sex differences in developmental programming models. Reproduction 2013;145(1): R1–13.
[41] Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. Endocrinology 2011;152(6):2228–36.
[42] Anway MD, Skinner MK. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. Reprod Biomed Online 2008;16(1):23–5.
[43] Martinez D, Pentinat T, Ribo S, Daviaud C, Bloks VW, Cebria J, et al. In utero undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered Lxra DNA methylation. Cell Metab 2014;19(6):941–51.
[44] Alter MD, Gilani AI, Champagne FA, Curley JP, Turner JB, Hen R. Paternal transmission of complex phenotypes in inbred mice. Biol Psychiatry 2009;66(11):1061–6.
[45] Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. Eur J Hum Genet 2002;10(11):682–8.
[46] Wu G, Feder A, Cohen H, Kim JJ, Calderon S, Charney DS, et al. Understanding resilience. Front Behav Neurosci 2013;7:10.
[47] Dias BG, Ressler KJ. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. Nat Neurosci 2014;17(1):89–96.
[48] Szyf M. Lamarck revisited: epigenetic inheritance of ancestral odor fear conditioning. Nat Neurosci 2014;17(1):2–4.
[49] Franklin TB, Linder N, Russig H, Thony B, Mansuy IM. Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. PLoS One 2011;6(7):e21842.
[50] Jordan B. Is resilience an epigenetic phenomenon? Med Sci (Paris) 2013;29(3):325–8.
[51] Klengel T, Mehta D, Anacker C, Rex-Haffner M, Pruessner JC, Pariante CM, et al. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. Nat Neurosci 2013;16(1):33–41.
[52] Scofield MD, Kalivas PW. Forgiving the sins of the fathers. Nat Neurosci 2013;16(1):4–5.
[53] Provencal N, Suderman MJ, Guillemin C, Vitaro F, Cote SM, Hallett M, et al. Association of childhood chronic physical aggression with a DNA methylation signature in adult human T cells. PLoS One 2014;9(4):e89839.
[54] Guillemin C, Provencal N, Suderman M, Cote SM, Vitaro F, Hallett M, et al. DNA methylation signature of childhood chronic physical aggression in T cells of both men and women. PLoS One 2014;9(1):e86822.
[55] Remy JJ. Stable inheritance of an acquired behavior in *Caenorhabditis elegans*. Curr Biol 2010;20(20):R877–8.
[56] Rechavi O, Minevich G, Hobert O. Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in *C. elegans*. Cell 2011;147(6):1248–56.

[57] Rechavi O. Guest list or black list: heritable small RNAs as immunogenic memories. Trends Cell Biol 2014;24(4):212–20.
[58] Attig L, Jais JP, Vigé A, Beauger A, Gross M-S, Gallou-Kabani C, et al. Locus-specific epigenetic changes associated with peripheral leptin-resistance in increased resistance to a high-fat diet in mice born to obese mothers fed a control diet during gestation. J DOHaD 2013;4(Suppl 1):S1–S2.
[59] Vassoler FM, White SL, Schmidt HD, Sadri-Vakili G, Pierce RC. Epigenetic inheritance of a cocaine-resistance phenotype. Nat Neurosci 2013;16(1):42–7.
[60] Yan W. Potential roles of noncoding RNAs in environmental epigenetic transgenerational inheritance. Mol Cell Endocrinol 2014;398(1–2):24–30.
[61] Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, et al. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. Nat Neurosci 2014;17(5):667–9.
[62] Junien C, et al. Le nouveau paradigme de l'Origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD), Epigénétique, Environnement: preuves et chaînons manquants. Med Sci 2015, in press.
[63] Arai JA, Feig LA. Long-lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment on memory formation. Brain Res Bull 2011;85(1–2):30–5.
[64] Junien C. L'empreinte parentale: de la guerre des sexes à la solidarité entre générations. Médecine/Sciences 2000;3:336–44.
[65] Bromfield JJ, Schjenken JE, Chin PY, Care AS, Jasper MJ, Robertson SA. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. Proc Natl Acad Sci USA 2014;111(6):2200–5.
[66] Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. Transcriptional sexual dimorphism during preimplantation embryo development and its consequences for developmental competence and adult health and disease. Reproduction 2011;141(5):563–70.
[67] Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107(8):3394–9.
[68] Penaloza C, Estevez B, Orlanski S, Sikorska M, Walker R, Smith C, et al. Sex of the cell dictates its response: differential gene expression and sensitivity to cell death inducing stress in male and female cells. FASEB J 2009;23(6):1869–79.
[69] Howerton CL, Bale TL. Prenatal programing: at the intersection of maternal stress and immune activation. Horm Behav 2012;62(3):237–42.
[70] Gabory A, Attig L, Junien C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. Mol Cell Endocrinol May 25, 2009;304(1–2):8–18.
[71] Davies W, Wilkinson LS. It is not all hormones: alternative explanations for sexual differentiation of the brain. Brain Res 2006;1126(1):36–45.
[72] Xu J, Disteche CM. Sex differences in brain expression of X- and Y-linked genes. Brain Res 2006;1126(1):50–5.
[73] Kwong WY, Miller DJ, Wilkins AP, Dear MS, Wright JN, Osmond C, et al. Maternal low protein diet restricted to the preimplantation period induces a gender-specific change on hepatic gene expression in rat fetuses. Mol Reprod Dev 2007;74(1):48–56.
[74] Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. Nature 2010;467(7318):963–6.
[75] Clifton VL. Review: sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. Placenta 2010;31(Suppl):S33–9.
[76] Gallou-Kabani C, Gabory A, Tost J, Karimi M, Mayeur S, Lesage J, et al. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. PLoS One 2010;5(12):e14398.
[77] Eriksson JG, Kajantie E, Osmond C, Thornburg K, Barker DJ. Boys live dangerously in the womb. Am J Hum Biol 2009;22(3):330–5.
[78] Okamoto I, Patrat C, Thepot D, Peynot N, Fauque P, Daniel N, et al. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. Nature 2011;472(7343):370–4.
[79] Berletch JB, Yang F, Xu J, Carrel L, Disteche CM. Genes that escape from X inactivation. Hum Genet 2011;130(2):237–45.
[80] Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. Nature 2005;434(7031):400–4.
[81] Prothero KE, Stahl JM, Carrel L. Dosage compensation and gene expression on the mammalian X chromosome: one plus one does not always equal two. Chromosome Res 2009;17(5):637–48.
[82] Yang F, Babak T, Shendure J, Disteche CM. Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. Genome Res 2010;20(5):614–22.
[83] Dementyeva EV, Shevchenko AI, Anopriyenko OV, Mazurok NA, Elisaphenko EA, Nesterova TB, et al. Difference between random and imprinted X inactivation in common voles. Chromosoma 2010;119(5):541–52.
[84] Chow J, Heard E. X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. Curr Opin Cell Biol 2009;21(3):359–66.
[85] Patrat C, Okamoto I, Diabangouaya P, Vialon V, Le Baccon P, Chow J, et al. Dynamic changes in paternal X-chromosome activity during imprinted X-chromosome inactivation in mice. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(13):5198–203.

[86] Kobayashi S, Fujihara Y, Mise N, Kaseda K, Abe K, Ishino F, et al. The X-linked imprinted gene family Fthl17 shows predominantly female expression following the two-cell stage in mouse embryos. Nucleic Acids Res 2010;38(11):3672–81.
[87] Bellott DW, Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG, Pyntikova T, Cho TJ, et al. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. Nature 2014;508(7497):494–9.
[88] Charchar FJ, Bloomer LD, Barnes TA, Cowley MJ, Nelson CP, Wang Y, et al. Inheritance of coronary artery disease in men: an analysis of the role of the Y chromosome. Lancet 2012;379(9819):915–22.
[89] Lesch BJ, Dokshin GA, Young RA, McCarrey JR, Page DC. A set of genes critical to development is epigenetically poised in mouse germ cells from fetal stages through completion of meiosis. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110(40):16061–6.
[90] Reinius B, Jazin E. Prenatal sex differences in the human brain. Mol Psychiatry 2009;14(11):987, 8–9.
[91] Reinius B, Shi C, Hengshuo L, Sandhu KS, Radomska KJ, Rosen GD, et al. Female-biased expression of long non-coding RNAs in domains that escape X-inactivation in mouse. BMC Genomics 2010;11:614.
[92] Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. Nature 2005;434(7031):325–37.
[93] Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature 2003;423(6942):825–37.
[94] Disteche CM, Filippova GN, Tsuchiya KD. Escape from X inactivation. Cytogenet Genome Res 2002;99(1–4):36–43.
[95] Berletch JB, Yang F, Disteche CM. Escape from X inactivation in mice and humans. Genome Biol 2010;11(6):213.
[96] Xu J, Watkins R, Arnold AP. Sexually dimorphic expression of the X-linked gene Eif2s3x mRNA but not protein in mouse brain. Gene Expr Patterns 2006;6(2):146–55.
[97] Heijmans BT, Tobi EW, Lumey LH, Slagboom PE. The epigenome: archive of the prenatal environment. Epigenetics 2009;4(8):526–31.
[98] Wu Q, Suzuki M. Parental obesity and overweight affect the body-fat accumulation in the offspring: the possible effect of a high-fat diet through epigenetic inheritance. Obes Rev 2006;7(2):201–8.
[99] Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. Physiol Genomics 2008;32(2):264–72.
[100] Page-Lariviere F, Sirard MA. Spatiotemporal expression of DNA demethylation enzymes and histone demethylases in bovine embryos. Cell Reprogram 2014;16(1):40–53.
[101] Lu H, Cui JY, Gunewardena S, Yoo B, Zhong XB, Klaassen CD. Hepatic ontogeny and tissue distribution of mRNAs of epigenetic modifiers in mice using RNA-sequencing. Epigenetics 2012;7(8):914–29.
[102] Mank JE, Nam K, Brunstrom B, Ellegren H. Ontogenetic complexity of sexual dimorphism and sex-specific selection. Mol Biol Evol 2010;27(7):1570–8.
[103] Xu H, Wang F, Liu Y, Yu Y, Gelernter J, Zhang H. Sex-biased methylome and transcriptome in human prefrontal cortex. Hum Mol Genet 2014;23(5):1260–70.
[104] Ammerpohl O, Bens S, Appari M, Werner R, Korn B, Drop SL, et al. Androgen receptor function links human sexual dimorphism to DNA methylation. PLoS One 2013;8(9):e73288.
[105] Bermejo-Alvarez P, Lonergan P, Rath D, Gutierrez-Adan A, Rizos D. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. Reprod Fertil Dev 2010;22(2):426–36.
[106] Zvetkova I, Apedaile A, Ramsahoye B, Mermoud JE, Crompton LA, John R, et al. Global hypomethylation of the genome in XX embryonic stem cells. Nat Genet 2005;37(11):1274–9.
[107] Kang HJ, Kawasawa YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M, et al. Spatio-temporal transcriptome of the human brain. Nature 2012;478(7370):483–9.
[108] Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L, et al. Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. Genome Res 2006;16(8):995–1004.
[109] Qureshi IA, Mehler MF. Genetic and epigenetic underpinnings of sex differences in the brain and in neurological and psychiatric disease susceptibility. Prog Brain Res 2010;186:77–95.
[110] McCarthy MM, Auger AP, Bale TL, De Vries GJ, Dunn GA, Forger NG, et al. The epigenetics of sex differences in the brain. J Neurosci 2009;29(41):12815–23.
[111] Waxman DJ, Holloway MG. Centennial perspective: sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. Mol Pharmacol 2009;76:215–228.
[112] Ling G, Sugathan A, Mazor T, Fraenkel E, Waxman DJ. Unbiased, genome-wide in vivo mapping of transcriptional regulatory elements reveals sex differences in chromatin structure associated with sex-specific liver gene expression. Mol Cell Biol 2010;30(23):5531–44.
[113] van Nas A, Guhathakurta D, Wang SS, Yehya N, Horvath S, Zhang B, et al. Elucidating the role of gonadal hormones in sexually dimorphic gene coexpression networks. Endocrinology 2009;150(3):1235–49.
[114] Wauthier V, Sugathan A, Meyer RD, Dombkowski AA, Waxman DJ. Intrinsic sex differences in the early growth hormone responsiveness of sex-specific genes in mouse liver. Mol Endocrinol 2010;24(3):667–78.

[115] Gregg C, Zhang J, Weissbourd B, Luo S, Schroth GP, Haig D, et al. High-resolution analysis of parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. Science 2010;329(5992):643–8.
[116] Gregg C, Zhang J, Butler JE, Haig D, Dulac C. Sex-specific parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. Science 2010;329(5992):682–5.
[117] Xu J, Deng X, Disteche CM. Sex-specific expression of the X-linked histone demethylase gene Jarid1c in brain. PLoS One 2008;3(7):e2553.
[118] Xu J, Deng X, Watkins R, Disteche CM. Sex-specific differences in expression of histone demethylases Utx and Uty in mouse brain and neurons. J Neurosci 2008;28(17):4521–7.
[119] Isensee J, Witt H, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V, Noppinger PR. Sexually dimorphic gene expression in the heart of mice and men. J Mol Med (Berl) 2008;86(1):61–74.
[120] Wilda M, Bachner D, Zechner U, Kehrer-Sawatzki H, Vogel W, Hameister H. Do the constraints of human speciation cause expression of the same set of genes in brain, testis, and placenta? Cytogenet Cell Genet 2000;91(1–4):300–2.
[121] Xu J, Burgoyne PS, Arnold AP. Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain. Hum Mol Genet 2002;11(12):1409–19.
[122] Kelsey G. Epigenetics and the brain: transcriptome sequencing reveals new depths to genomic imprinting. Bioessays 2011;33(5):362–7.
[123] Yuan Y, Chen YP, Boyd-Kirkup J, Khaitovich P, Somel M. Accelerated aging-related transcriptome changes in the female prefrontal cortex. Aging Cell 2012;11(5):894–901.
[124] Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, et al. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. Science 2013;341(6146):1237905.
[125] Moritz KM, Cuffe JS, Wilson LB, Dickinson H, Wlodek ME, Simmons DG, et al. Review: sex specific programming: a critical role for the renal renin-angiotensin system. Placenta 2010;31(Suppl.):S40–6.
[126] Clifton VL, Hodyl NA, Murphy VE, Giles WB, Baxter RC, Smith R. Effect of maternal asthma, inhaled glucocorticoids and cigarette use during pregnancy on the newborn insulin-like growth factor axis. Growth Horm IGF Res 2010;20(1):39–48.
[127] Mao J, Zhang X, Sieli PT, Falduto MT, Torres KE, Rosenfeld CS. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107(12):5557–62.
[128] Goel N, Bale TL. Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. J Neuroendocrinol 2009;21(4):415–20.
[129] Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. Environ Health 2012;11:42.
[130] Novakovic B, Saffery R. The ever growing complexity of placental epigenetics - role in adverse pregnancy outcomes and fetal programming. Placenta 2012; 33(12):959–70.
[131] Nielsen CH, Larsen A, Nielsen AL. DNA methylation alterations in response to prenatal exposure of maternal cigarette smoking: a persistent epigenetic impact on health from maternal lifestyle?. Arch Toxicol 2014.
[132] Zhao Y, Shi HJ, Xie CM, Chen J, Laue H, Zhang YH. Prenatal phthalate exposure, infant growth, and global DNA methylation of human placenta. Environ Mol Mutagen 2015;56(3):286–92.
[133] Marsit CJ. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. J Exp Biol 2015;218(Pt 1):71–9.
[134] Hemberger M. Epigenetic landscape required for placental development. Cell Mol Life Sci 2007;64(18): 2422–36.
[135] Cleal JK, Day PL, Hanson MA, Lewis RM. Sex differences in the mRNA levels of housekeeping genes in human placenta. Placenta 2010;31(6):556–7.
[136] Lucas ES, Watkins AJ, Cox AL, Marfy-Smith SJ, Smyth N, Fleming TP. Tissue-specific selection of reference genes is required for expression studies in the mouse model of maternal protein undernutrition. Theriogenology 2011;76(3):558–69.
[137] Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, Brown PO. Gene expression patterns in human placenta. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(14):5478–83.
[138] Ishikawa H, Rattigan A, Fundele R, Burgoyne PS. Effects of sex chromosome dosage on placental size in mice. Biol Reprod 2003;69(2):483–8.
[139] Hemberger M. The role of the X chromosome in mammalian extra embryonic development. Cytogenet Genome Res 2002;99(1–4):210–7.
[140] Zechner U, Hemberger M, Constancia M, Orth A, Dragatsis I, Luttges A, et al. Proliferation and growth factor expression in abnormally enlarged placentas of mouse interspecific hybrids. Dev Dyn 2002;224(2): 125–34.
[141] Hemberger M, Kurz H, Orth A, Otto S, Luttges A, Elliott R, et al. Genetic and developmental analysis of X-inactivation in interspecific hybrid mice suggests a role for the Y chromosome in placental dysplasia. Genetics 2001;157(1):341–8.
[142] Walker MG, Fitzgerald B, Keating S, Ray JG, Windrim R, Kingdom JC. Sex-specific basis of severe placental dysfunction leading to extreme preterm delivery. Placenta 2012;33(7):568–71.

[143] Yalcinkaya TM, Siiteri PK, Vigne JL, Licht P, Pavgi S, Frank LG, et al. A mechanism for virilization of female spotted hyenas in utero. Science 1993;260(5116):1929–31.
[144] Al-Khan A, Aye IL, Barsoum I, Borbely A, Cebral E, Cerchi G, et al. IFPA Meeting 2010 Workshops Report II: placental pathology; trophoblast invasion; fetal sex; parasites and the placenta; decidua and embryonic or fetal loss; trophoblast differentiation and syncytialisation. Placenta 2011;32(Suppl. 2):S90–9.
[145] Osei-Kumah A, Smith R, Jurisica I, Caniggia I, Clifton VL. Sex-specific differences in placental global gene expression in pregnancies complicated by asthma. Placenta 2011;32(8):570–8.
[146] Laguna-Barraza R, Bermejo-Alvarez P, Ramos-Ibeas P, de Frutos C, Lopez-Cardona AP, Calle A, et al. Sex-specific embryonic origin of postnatal phenotypic variability. Reprod Fertil Dev 2012;25(1):38–47.
[147] Brydges NM, Jin R, Seckl J, Holmes MC, Drake AJ, Hall J. Juvenile stress enhances anxiety and alters corticosteroid receptor expression in adulthood. Brain Behav 2014;4(1):4–13.
[148] Rando OJ. Daddy issues: paternal effects on phenotype. Cell 2012;151(4):702–8.
[149] Lecomte V, Youngson NA, Maloney CA, Morris MJ. Parental programming: how can we improve study design to discern the molecular mechanisms? Bioessays 2013;35(9):787–93.
[150] Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, et al. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. Cell 2010;143(7):1084–96.
[151] Puri D, Dhawan J, Mishra RK. The paternal hidden agenda: epigenetic inheritance through sperm chromatin. Epigenetics 2010;5(5):386–91.
[152] Alminana C, Caballero I, Heath PR, Maleki-Dizaji S, Parrilla I, Cuello C, et al. The battle of the sexes starts in the oviduct: modulation of oviductal transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa. BMC Genomics 2014;15:293.
[153] Hackett JA, Surani MA, Beyond DNA. programming and inheritance of parental methylomes. Cell 2013;153(4):737–9.
[154] Duffie R, Bourc'his D. Parental epigenetic asymmetry in mammals. Curr Top Dev Biol 2013;104:293–328.
[155] Watkins AJ, Lucas ES, Wilkins A, Cagampang FR, Fleming TP. Maternal periconceptional and gestational low protein diet affects mouse offspring growth, cardiovascular and adipose phenotype at 1 year of age. PLoS One 2011;6(12):e28745.
[156] Northstone K, Golding J, Davey Smith G, Miller LL, Pembrey M. Prepubertal start of father's smoking and increased body fat in his sons: further characterisation of paternal transgenerational responses. Eur J Hum Genet 2014;22(12):1382–6.
[157] Miller LL, Pembrey M, Davey Smith G, Northstone K, Golding J. Is the growth of the fetus of a non-smoking mother influenced by the smoking of either grandmother while pregnant? PLoS One 2014;9(2):e86781.
[158] Puschendorf M, Terranova R, Boutsma E, Mao X, Isono K, Brykczynska U, et al. PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. Nat Genet 2008;40(4):411–20.
[159] Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. Reproduction 2011;141(1):21–36.
[160] Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. Nature 2009;460(7254):473–8.
[161] Carone BR, Hung JH, Hainer SJ, Chou MT, Carone DM, Weng Z, et al. High-resolution mapping of chromatin packaging in mouse embryonic stem cells and sperm. Dev Cell 2014;30(1):11–22.
[162] Erkek S, Hisano M, Liang CY, Gill M, Murr R, Dieker J, et al. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. Nat Struct Mol Biol 2013;20(7):868–75.
[163] Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. Nat Struct Mol Biol 2010;17(6):679–87.
[164] Saitou M, Kurimoto K. Paternal nucleosomes: are they retained in developmental promoters or gene deserts? Dev Cell 2014;30(1):6–8.
[165] Watkins AJ, Platt D, Papenbrock T, Wilkins A, Eckert JJ, Kwong WY, et al. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104(13):5449–54.
[166] Watkins AJ, Wilkins A, Cunningham C, Perry VH, Seet MJ, Osmond C, et al. Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. J Physiol 2008;586(8):2231–44.
[167] Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. Biol Reprod 1995;53(6):1385–91.
[168] Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104(49):19351–6.
[169] Ecker DJ, Stein P, Xu Z, Williams CJ, Kopf GS, Bilker WB, et al. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101(6):1595–600.

[170] Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, Perez-Crespo M, Ramirez MA, et al. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101(16):5880–5.
[171] Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, et al. The embryo and its future. Biol Reprod 2004;71(4):1046–54.
[172] Sinclair KD, Singh R. Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo. Theriogenology 2007;67(1):43–53.
[173] Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. Development 2000;127(19):4195–202.
[174] Ashworth CJ, Toma LM, Hunter MG. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2009;364(1534):3351–61.
[175] Edwards D. Non-linear normalization and background correction in one-channel cDNA microarray studies. Bioinformatics 2003;19(7):825–33.
[176] Symonds ME, Pearce S, Bispham J, Gardner DS, Stephenson T. Timing of nutrient restriction and programming of fetal adipose tissue development. Proc Nutr Soc 2004;63(3):397–403.
[177] Mitchell M, Schulz SL, Armstrong DT, Lane M. Metabolic and mitochondrial dysfunction in early mouse embryos following maternal dietary protein intervention. Biol Reprod 2009;80(4):622–30.
[178] Duranthon V, Evsikov A, Khan D, Bui LC, Leandri R, Rodrigues A, et al. Differential regulation of LTR retrotransposons during the transition from totipotency to pluripotency in mammalian embryos. Retrovirology 2009;6.
[179] McEvoy JM, Doherty AM, Finnerty M, Sheridan JJ, McGuire L, Blair IS, et al. The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. Lett Appl Microbiol 2000;30(5):390–5.
[180] Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. Hum Mol Genet 2009;18(20):3769–78.
[181] Corry GN, Tanasijevic B, Barry ER, Krueger W, Rasmussen TP. Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation development. Birth Defects Res C Embryo Today 2009;87(4):297–313.
[182] Aranda P, Agirre X, Ballestar E, Andreu EJ, Roman-Gomez J, Prieto I, et al. Epigenetic signatures associated with different levels of differentiation potential in human stem cells. PLoS One 2009;4(11):e7809.
[183] Cowley M, Oakey RJ. Resetting for the next generation. Mol Cell 2012;48(6):819–21.
[184] Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. Mech Dev 2002;117(1–2):15–23.
[185] Holland ML, Rakyan VK. Transgenerational inheritance of non-genetically determined phenotypes. Biochem Soc Trans 2013;41(3):769–76.
[186] Morrison KE, Rodgers AB, Morgan CP, Bale TL. Epigenetic mechanisms in pubertal brain maturation. Neuroscience 2014;264:17–24.
[187] Paul S, Knott JG. Epigenetic control of cell fate in mouse blastocysts: the role of covalent histone modifications and chromatin remodeling. Mol Reprod Dev 2014;81(2):171–82.
[188] Gill ME, Erkek S, Peters AH. Parental epigenetic control of embryogenesis: a balance between inheritance and reprogramming? Curr Opin Cell Biol 2012;24(3):387–96.
[189] Riising EM, Comet I, Leblanc B, Wu X, Johansen JV, Helin K. Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. Mol Cell 2014;55(3):347–60.
[190] Festenstein R, Chan JP. Context is everything: activators can also repress. Nat Struct Mol Biol 2012;19(10):973–5.
[191] Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schubeler D, Sasaki H, et al. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. Nat Genet 2010;42(12):1093–100.
[192] Guo F, Li X, Liang D, Li T, Zhu P, Guo H, et al. Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. Cell Stem Cell 2014;15(4):447–58.
[193] Smith ZD, Chan MM, Humm KC, Karnik R, Mekhoubad S, Regev A, et al. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. Nature 2014;511(7511):611–5.
[194] Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, et al. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. Genesis 2003;35(2):88–93.
[195] Radford EJ, Ito M, Shi H, Corish JA, Yamazawa K, Isganaitis E, et al. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. Science 2014;345(6198):1255903.
[196] King V, Dakin RS, Liu L, Hadoke PW, Walker BR, Seckl JR, et al. Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation. Endocrinology 2013;154(7):2514–24.
[197] Saab BJ, Mansuy IM. Neuroepigenetics of memory formation and impairment: the role of microRNAs. Neuropharmacology 2014;80C:61–9.

[198] Liu WM, Pang RT, Chiu PC, Wong BP, Lao K, Lee KF, et al. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109(2):490–4.
[199] Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, Grandjean V, Gounon P, Cuzin F, et al. RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. Dev Cell 2008;14(6):962–9.
[200] Abramowitz LK, Bartolomei MS. Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. Curr Opin Genet Dev 2012;22(2):72–8.
[201] Rodgers AB, Morgan CP, Bronson SL, Revello S, Bale TL. Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. J Neurosci 2013;33(21):9003–12.
[202] Drake AJ, Seckl JR. Transmission of programming effects across generations. Pediatr Endocrinol Rev 2011;9(2):566–78.
[203] Sharma A. Bioinformatic analysis revealing association of exosomal mRNAs and proteins in epigenetic inheritance. J Theor Biol 2014;357:143–9.
[204] Matthews SG, Phillips DI. Transgenerational inheritance of stress pathology. Exp Neurol 2012;233(1):95–101.
[205] Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. Endocrinology 2006;147(Suppl. 6):S11–7.
[206] Kalfa N, Paris F, Soyer-Gobillard MO, Daures JP, Sultan C. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. Fertil Steril 2011;95(8):2574–7.
[207] Skinner MK, Haque CG, Nilsson E, Bhandari R, McCarrey JR. Environmentally induced transgenerational epigenetic reprogramming of primordial germ cells and the subsequent germ line. PLoS One 2013;8(7):e66318.
[208] Burdge GC, Hoile SP, Uller T, Thomas NA, Gluckman PD, Hanson MA, et al. Progressive, transgenerational changes in offspring phenotype and epigenotype following nutritional transition. PLoS One 2011;6(11):e28282.
[209] Nilsson EE, Anway MD, Stanfield J, Skinner MK. Transgenerational epigenetic effects of the endocrine disruptor vinclozolin on pregnancies and female adult onset disease. Reproduction 2008;135(5):713–21.
[210] Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG. Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female. Faseb J 2007;21(12):3380–5.
[211] Chang HS, Anway MD, Rekow SS, Skinner MK. Transgenerational epigenetic imprinting of the male germ-line by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. Endocrinology 2006;147(12):5524–41.
[212] Benyshek DC, Johnston CS, Martin JF. Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. Diabetologia 2006;49(5):1117–9.
[213] Boucher BJ, Ewen SW, Stowers JM. Betel nut (Areca catechu) consumption and the induction of glucose intolerance in adult CD1 mice and in their F1 and F2 offspring [see comments]. Diabetologia 1994;37(1):49–55.
[214] Seong KH, Li D, Shimizu H, Nakamura R, Ishii S. Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. Cell 2011;145(7):1049–61.
[215] Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nat Rev Genet 2007;8(4):253–62.
[216] Daxinger L, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers. Genome Res 2010;20(12):1623–8.
[217] Rando OJ, Verstrepen KJ. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. Cell 2007;128(4):655–68.
[218] Kaufman PD, Rando OJ. Chromatin as a potential carrier of heritable information. Curr Opin Cell Biol 2010;22(3):284–90.
[219] Dietz DM, Nestler EJ. From father to offspring: paternal transmission of depressive-like behaviors. Neuropsychopharmacology 2012;37(1):311–2.
[220] Pryke SR, Griffith SC. Genetic incompatibility drives sex allocation and maternal investment in a polymorphic finch. Science 2009;323(5921):1605–7.
[221] Lock M. The lure of the epigenome. Lancet 2013;381(9881):1896–7.
[222] Burdge GC, Lillycrop KA. Bridging the gap between epigenetics research and nutritional public health interventions. Genome Med 2010;2(11):80.
[223] Waddell J, McCarthy MM. Sexual differentiation of the brain and ADHD: what is a sex difference in prevalence telling us? Curr Top Behav Neurosci 2012;9:341–60.
[224] Arnold AP, van Nas A, Lusis AJ. Systems biology asks new questions about sex differences. Trends Endocrinol Metab 2009;20(10):471–6.
[225] Arnold AP, Lusis AJ. Understanding the sexome: measuring and reporting sex differences in gene systems. Endocrinology 2012;153(6):2551–5.
[226] Martin DI, Cropley JE, Suter CM. Epigenetics in disease: leader or follower? Epigenetics 2011;6(7):843–8.
[227] Reik W, Kelsey G. Epigenetics: cellular memory erased in human embryos. Nature 2014;511(7511):540–1.
[228] Wu Q, Laloë D, Jaffrezic F, Attig L, Vigé A, Beauger A, et al. Sexual dimorphism of hepatic epigenetic marks and machinery in offspring of obese and diabetic mothers fed a control diet (CD) during periconceptional/gestation/lactation period. J DOHaD 2013;4(Suppl 1):S1–S2.

[229] Jessen HM, Auger AP. Sex differences in epigenetic mechanisms may underlie risk and resilience for mental health disorders. Epigenetics 2012;6(7):857–61.
[230] Doyle O, Harmon CP, Heckman JJ, Tremblay RE. Investing in early human development: timing and economic efficiency. Econ Hum Biol 2009;7(1):1–6.
[231] Hanson MA, Gluckman PD, Ma RC, Matzen P, Biesma RG. Early life opportunities for prevention of diabetes in low and middle income countries. BMC Public Health 2012;12(1):1025.
[232] Cantone I, Fisher AG. Epigenetic programming and reprogramming during development. Nat Struct Mol Biol 2013;20(3):282–9.
[233] Bourc'his D, Voinnet O. A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development. Science 2010;330(6004):617–22.

médecine/sciences 2015 ; 32 : 000-00

Le nouveau paradigme de l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD)

Épigénétique, environnement : preuves et chaînons manquants

Claudine Junien[1], Polina Panchenko[1,2], Luciano Pirola[3], Valérie Amarger[4], Bertrand Kaeffer[4], Patricia Parnet[4], Jérôme Torrisani[5], Francisco Bolaños Jimenez[4], Hélène Jammes[1], Anne Gabory[1]

> Selon le nouveau paradigme des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD), des modifications épigénétiques retiennent la mémoire des effets des facteurs environnementaux auxquels un individu est soumis tout au long de sa vie. Une période cruciale est celle du développement précoce, pré et postnatal ; cruciale parce que l'épigénome y est particulièrement sensible aux effets de l'environnement, et aussi parce que l'individu construit son capital santé pour répondre ultérieurement, plus ou moins bien, aux aléas de la vie. Le défi pour la recherche est de déchiffrer comment les facteurs conférant une susceptibilité accrue ou une résilience vis-à-vis du développement des maladies agissent et influencent les mécanismes épigénétiques. Le défi pour la puissance publique est de traduire en actions et en bénéfices pour la santé ces découvertes scientifiques *via*, entre autres, l'établissement de recommandations capables de freiner l'incidence croissante des maladies chroniques. <

[1] Inra, UMR1198, biologie du développement et reproduction, Domaine de Vilvert, Batiment 230, F-78352 Jouy-en-Josas, France ;
[2] Université Pierre et Marie Curie, F-75005 Paris, France ;
[3] Institut Carmen, Inserm U1060, Oullins, France ;
[4] UMR 1280 Inra université de Nantes, Institut des maladies de l'appareil digestif, Nantes, France ;
[5] Inserm UMR1037, Centre de recherches en cancérologie de Toulouse, université de Toulouse III Paul Sabatier, F-31037 Toulouse, France.
claudine.junien@jouy.inra.fr

Épigénétique et environnement : la révolution

La découverte de l'incorporation des impacts de l'environnement dans l'épigénome représente une véritable révolution : qui aurait pu imaginer que les épreuves physiques et psychologiques endurées par des femmes enceintes lors de l'épisode *Ice storm* au Québec en 1998[1], ou des attentats du 11 septembre 2001[2] allaient laisser des traces dans l'épigénome des fœtus et influencer leur phénotype et leur devenir [1, 2] ? Ainsi, selon le nouveau paradigme des « origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD) », l'environnement peut laisser sur notre épigénome des traces qui sont conservées longtemps après l'exposition à l'événement, voire qui sont transmises aux générations suivantes, sans altérer la séquence de l'ADN, *via* nos épigénomes. Dès 2004, les groupes de M. Szyf et de M. Meaney montrèrent que chez le rat, la qualité des soins maternels durant la période postnatale conditionne pour la vie, la réactivité au stress de leur progéniture [3]. Ces soins modifient dans l'hippocampe, l'épigénome d'un gène clé, celui qui code le récepteur aux glucocorticoïdes, mais également l'épigénome de réseaux de gènes [4]. Des mécanismes semblables opèrent chez le rongeur, le macaque et l'humain [5, 6], montrant la conservation entre les espèces des mécanismes impliqués dans de tels processus d'adaptation à l'environnement. Des mécanismes épigénétiques ont depuis été impliqués dans les effets, sur la progéniture, de divers stimulus environnementaux subis à différents stades par la mère ou par le père : nutrition déséquilibrée, adversité, stress, peur du prédateur, défaite sociale, etc. [5, 7-12] (➜).

(➜) Voir page ??? de ce numéro

[1] L'épisode *Ice storm* (tempête de pluie verglaçante) est une période de cinq jours consécutifs en janvier 1998 où une série de perturbations météorologiques provoquèrent des pluies verglaçantes dans l'est du Canada, la Nouvelle-Angleterre et le nord de l'État de New York. Le verglas a provoqué l'un des plus importants désastres naturels en Amérique du Nord.

[2] Les attentats-suicides du 11 septembre 2001 ont été perpétrés le même jour aux États-Unis faisant 2 977 victimes.

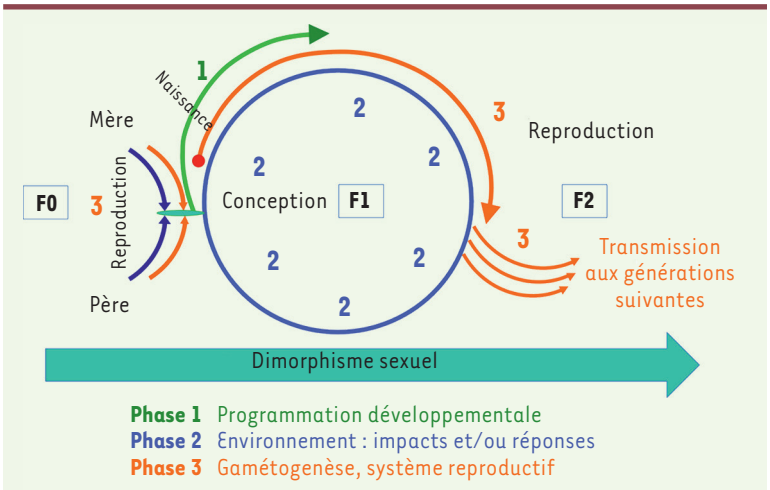


Figure 1. ***Le cycle de la vie.*** La DOHaD comprend trois grandes phases : (1) la phase développementale de programmation de l'individu – couvrant la gestation, la petite enfance, et aussi l'adolescence – caractérisée par une grande plasticité de l'épigénome; (2) la phase des effets à moyen et long terme, conséquences des perturbations développementales, mais auxquelles viennent s'associer, tout au long de la vie, les effets fluctuants ou permanents de l'environnement; (3) la phase de reproduction puis les effets ou réponses inter- et transgénérationnels. Au cours de ces phases les différentes perturbations subies par les marques épigénétiques sous l'influence de l'environnement modulent le phénotype. Bien que le terme « transgénérationnel » puisse être utilisé souvent indifféremment, on se doit de distinguer les effets transgénérationnels des effets intergénérationnels ou multigénérationnels. Les premiers impliquent une transmission par la lignée germinale, pour la première génération hors de tout contact avec l'agent environnemental perturbateur. Cet effet transgénérationnel ne peut apparaître qu'au niveau de la F3 par la lignée maternelle, ou de la F2 par la lignée paternelle. Les effets observés en deçà sont appelés intergénérationnels. Les effets multigénérationnels correspondent à une exposition au même stress ou à un stress qui peut découler de la prem!ère exposition, sur plusieurs générations. Le point rouge représente après la conception le début de la gamétogénèse: le terme naissance reste postérieur. Enfin, il existe des différences entre les mâles et les femelles dues, dès la conception, à la différence entre les paires de chromosomes sexuels (XX et XY) puis, après la différenciation des gonades, avec l'expression des hormones sexuelles. Des différences très précoces d'expression de gènes de la machinerie épigénétique apposent des marques épigénétiques spécifiques du sexe qui établissent de façon temporaire ou pérenne des réseaux fonctionnels de gènes différents chez le mâle et la femelle. La gamétogenèse et la résistance à la reprogrammation sont aussi différentes entre le mâle et la femelle. On observe ainsi un dimorphisme sexuel, tant au niveau basal que pour les réponses à court terme ou à long terme [30].

Ces découvertes remettent en question la séparation entre l'inné et l'acquis, très prisée aux siècles derniers, au profit d'une frontière fluctuante et virtuelle. Le séquençage du génome a apporté une connaissance fabuleuse, mais ne nous offre qu'un nombre restreint de marqueurs de prédiction fiables quant à la susceptibilité à certaines maladies chroniques, une application qui n'est pas à la hauteur de l'espoir suscité. Une étude récente estime qu'à la naissance, les interactions gène/environnement liées à des processus épigénétiques représentent 75 % de la variabilité phénotypique, alors que le génotype ne rend compte que de 25 % [13]. Et pourtant, les marques épigénétiques ne s'apposent pas au hasard, mais dépendent aussi de la séquence de l'ADN. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les relations entre génétique et épigénétique, de les associer plutôt que de les opposer ou d'ignorer l'une ou l'autre [10, 14].

Selon l'OMS (Organisation mondiale de la santé), la prévalence des maladies chroniques augmentera de 17 % au cours de la prochaine décennie, ce qui représentera un coût humain et financier énorme. Le concept de DOHaD, parce qu'il s'intéresse aux origines de pathologies observées chez l'adulte (en général chronique) et ne se limite pas à une intervention à la période où la maladie est déjà installée – ce qui limite les chances de succès de la combattre – offre des possibilités de prévention. Il permet de distinguer, en termes d'impact environnemental et de réponse, trois grandes phases couvrant le cycle de la vie dans son intégralité *(Figure 1)*. Nous ne développerons ici que les deux premières phases, la troisième faisant l'objet de la seconde revue de C. Junien *et al.* (➜).

(➜) Voir la Synthèse de C. Junien *et al.*, page ??? de ce numéro

Pour comprendre les enjeux de ce nouveau concept de la DOHaD, il est essentiel de définir des termes comme épigénétique, dynamique *versus* stable, héritabilité au sens mitotique ou transgénérationnel, héréditaire, ainsi que les limites pratiques de la réversibilité théorique des marques épigénétiques. Ces définitions permettront d'expliciter les sources de confusion et de montrer comment l'épigénétique, un des supports moléculaires des phénomènes observés mais probablement pas le seul, offre dans toute sa diversité des possibilités insoupçonnées pour comprendre les processus de la DOHaD. Dans cette synthèse, notre objectif n'est pas de faire une revue exhaustive des mécanismes épigénétiques. D'excellentes revues décrivent les différents acteurs et les multiples variations épigénétiques observées jusqu'à présent dans diverses conditions et différentes espèces [15-19]. Notre but est de montrer, à l'aide de travaux récents, les vraies questions, approches et stratégies transdisciplinaires qui restent à mettre en place pour aborder ces mécanismes dans le contexte de la DOHaD *(Figure 2)*.

Les définitions de l'épigénétique : éphémères, ambiguës et controversées

En 1942, Conrad H. Waddington inventait le terme « épigénétique » (en anglais, *epigenetics*), compilation des

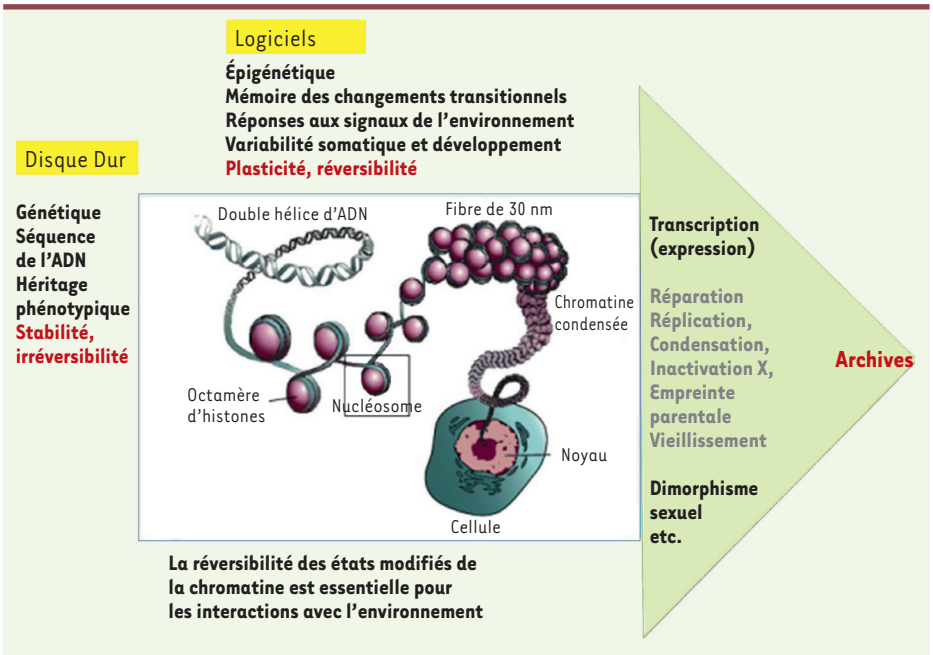


Figure 2. ***Génétique et épigénétique.*** Notre patrimoine génétique composé des 3 milliards de paires de bases, identique dans toutes nos cellules, n'est pas nu dans le noyau : il entoure un complexe protéique formé de 4 paires d'histones formant une série de « perles » appelées nucléosomes. Des modifications réversibles apposées soit sur la séquence d'ADN (méthylation), soit sur les histones participent au degré de compaction de la chromatine permettant ainsi à un gène de s'exprimer ou à l'inverse d'être réprimé. Ces mécanismes sont impliqués dans toute une série de mécanismes dont transcription (expression), réparation-réplication, condensation, inactivation de l'X, empreinte parentale, vieillissement, dimorphisme sexuel, etc. De plus, contrairement aux marques génétiques qui sont irréversibles, les marques épigénétiques, sensibles à tout type d'environnement, sont, par nature, réversibles.

termes « *epigenesis* » et « *genetics* » ; celui-ci désignait « *la branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype* »[3] [20]. Le sens du terme épigénétique change ensuite grâce à l'élucidation progressive de ses fondements moléculaires et devient « *l'étude des changements de la fonction des gènes héritables au niveau mitotique et/ou méiotique qui ne peuvent être expliqués par des changements dans la séquence de l'ADN* »[4] [21]. La première définition couvre l'activité des biologistes du développement, la seconde laisse la porte ouverte à tout ce qui n'est pas mutation dans l'ADN.

Puis Adrian Bird a revu la définition pour proposer : « *l'adaptation structurelle de régions chromosomiques permettant d'enregistrer, de signaler ou de perpétuer des états d'activité modifiés* »[5] [22]. Plus récemment, l'étude de systèmes, comme celui de l'horloge circadienne, qui par définition permet de faire fluctuer l'expression des gènes au cours au cours des 24 h de la journée [23], ou, comme la mémoire neuronale [24], révèle l'implication de mécanismes et d'outils typiquement épigénétiques mais n'impliquant, ni l'un ni l'autre, de division cellulaire, donc d'héritabilité mitotique [22]. Selon Adrian Bird, exiger le critère « héritable » pour définir un mécanisme comme étant épigénétique, c'est-à-dire la capacité de s'autoperpétuer lors de la division cellulaire, est source de confusions, d'amalgames, surtout avec la notion populaire de transmission à la génération suivante ; il ne se justifie plus et devrait être abandonné [22].

[3] *The term "epigenetics" was coined by Conrad Hal Waddington in 1942 to mean the study of the "causal mechanisms" of development, which bring the phenotype into being.*

[4] *In the context of molecular biology, epigenetics is defined as the study of mitotically or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in the DNA sequence.*

[5] *The structural adaptation of chromosomal regions so as to register, signal or perpetuate altered activity states.*

Phase 1 – Ontogenèse des paysages épigénétiques : dynamique et/ou stabilité de la chromatine

L'épigénome est constitué de multiples strates et facettes interconnectées qui varient au cours du temps et selon l'environnement. Après la fécondation, l'épigénome des gamètes parentaux subit une reprogrammation drastique : l'enlèvement des marques épigénétiques caractéristiques des gamètes et l'acquisition de nouvelles marques sont essentiels pour assurer la totipotence nécessaire au développement. Les mécanismes épigénétiques dans l'embryon précoce comprennent la méthylation, l'hydroxyméthylation de l'ADN et les modifications posttraductionnelles des histones (➜) et peuvent également inclure le remplacement de variants d'histones par d'autres. Dans les cellules souches embryonnaires (ES), un réseau unique de facteurs de transcription appelés facteurs pionniers (OCT4 [*octamer-binding transcription factor 4*], SOX2 [*sex determining region Y)-box 2*] et NANOG [*Homeobox protein NANOG*], pour les principaux) régule l'établissement et la maintenance de la pluripotence de ces cellules. L'introduction de ces facteurs pionniers dans une cellule souche totipotente, mais aussi dans une cellule somatique différenciée, entraîne des modifications épigénétiques très spécifiques (appelées reprogrammation) qui changent de manière spectaculaire le phénotype d'une cellule [25, 26]. Les profils des marques épigénétiques mises en place successivement au cours du développement permettent

(➜) Voir la Synthèse de C. Junien *et al.*, page ??? de ce numéro

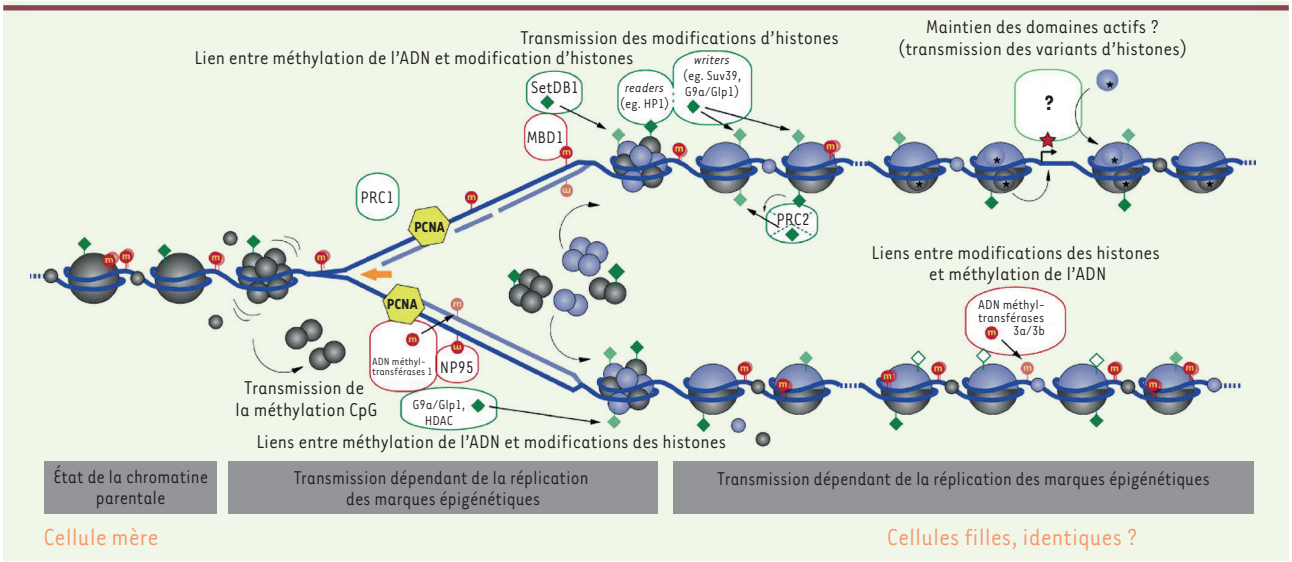


Figure 3. ***Héritabilité mitotique : de quoi la chromatine se souvient-elle et comment ? Mécanismes moléculaires sous-tendant la transmission épigénétique mitotique.*** Le schéma montre la réplication de l'ADN (bleu foncé, ADN parental ; bleu clair, ADN nouvellement synthétisé) à la fourche de réplication (flèche orange). Lors de la réplication, les nucléosomes parentaux (gris) sont dissociés et réassemblés sur les brins d'ADN néoformés en utilisant des histones parentales (gris) et nouvellement synthétisées (bleu). Les marques d'histone sont illustrées sous forme de carrés verts et les mécanismes responsables de leur transmission sont délimités en vert. La méthylation de l'ADN est illustrée sous forme de cercles rouges et les mécanismes responsables de la maintenance de la méthylation sont délimités en rouge. La transmission mitotique des marques épigénétiques peut être dépendante de la réplication, par exemple *via* le couplage avec la fourche de réplication, ou indépendante de la machinerie de réplication. Actuellement, on connaît très peu de choses sur la façon dont les domaines de la chromatine active sont maintenus (tracé vert clair). Contrairement à la fidélité de recopiage de la séquence d'ADN et de la méthylation de l'ADN, la duplication des histones ne se fait pas à partir d'une matrice et les modifications post traductionnelles ne sont pas conservées au moment où la cellule se divise. Les marques d'histones semblent s'apposer conformément à l'état transcriptionnel, mais après la réplication. Les gènes sont activés par des protéines régulatrices, les facteurs de transcription (FT), qui se fixent à l'ADN au niveau des promoteurs et *enhancers*. Au cours de la réplication cellulaire, ceux-ci sont distribués aux cellules filles qui les séquestrent car leur présence continuelle est requise. Les histones néosynthétisées viennent s'associer aux histones parentales porteuses des modifications post-traductionnelles, disloquées lors de la progression de la fourche de réplication. Des protéines de type chaperon les accompagnent. Contrairement à la méthylation de l'ADN, le mécanisme par lequel les profils de modifications post traductionnelles des histones sont rétablis après chaque division demeure obscur et l'objet d'ardents débats. En effet, des altérations des systèmes Polycomb/trithorax sont souvent héritées par les générations suivantes de cellules et parfois d'organismes (d'après [61]).

de représenter dans toute leur diversité les programmes d'expression génique nécessaires pour construire harmonieusement les différentes parties d'un organisme [27]. Ainsi nos 23 000 gènes ne s'expriment pas de la même façon dans les différents types cellulaires et selon le sexe ou l'âge. Cette plasticité dépend de marques épigénétiques versatiles et également d'ARN non codants [28] pour répondre à un environnement qui change, à tous les stades de la vie [29].

Pourquoi les phases précoces du développement constituent des fenêtres sensibles ou insensibles

Les phases précoces du développement offrent une large gamme d'opportunités éphémères pour façonner les marques épigénétiques, la conformation de la chromatine, au gré de l'environnement, selon le stade de développement, l'âge, le statut physiopathologique, le sexe et, plus tard, le genre [30]. Les cellules ES[6] ont une chromatine « ouverte » et active. Les gènes de développement sont marqués à la fois par la marque épigénétique répressive H3K27me3 (correspondant à la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3) et par la marque activatrice H3K4me3 (triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3) d'où le terme de marques bivalentes. Ces gènes sont silencieux mais « prêts » à s'exprimer (*primed*) ou à être inhibés, selon qu'ils perdent l'une ou l'autre des deux marques avant ou au cours de la différenciation cellulaire, qui s'accompagne d'un remodelage global de la chromatine [31] *(Figure 3)*. Les cellules ES (*embryonic stem cells*) éteignent les gènes de pluripotence et acquièrent le phénotype de cellules différenciées distinctes en activant les gènes spécifiques de lignage et en réprimant les gènes spécifiques des autres lignages inappropriés [31]. Ainsi les gènes actifs contiennent généralement la marque « activatrice » H3K4me3 au niveau de leur promoteur et les marques H3K4me1/me2 et H3K27ac (lysine 27

[6] Les cellules ES sont artéfactuelles et ne sont qu'un modèle qui ne reproduit pas nécessairement ce qui se passe *in vivo* dans l'embryon précoce.

acétylée) au niveau de leurs *enhancers*. Les locus réprimés sont enrichis en H3K27me3 et/ou en méthylation de l'ADN, qui semblent réprimer des locus distincts. Il n'est donc pas étonnant qu'un facteur environnemental puisse laisser un impact dans un contexte chromatinien donné et pas dans un autre.

Comment garder la mémoire ? L'héritabilité mitotique

Quels mécanismes assurent la propagation de la mémoire des impacts de l'environnement ? Chez les eucaryotes, hormis durant les processus de différenciation, le statut actif ou réprimé des gènes est héritable puisqu'il est transmis à l'identique au cours des divisions cellulaires, à la descendance des cellules [32].

L'héritabilité n'a pas donc le même sens selon que l'on parle d'héritabilité « mitotique » – au cours des divisions cellulaires d'un même organisme -, ce qui faisait partie de la définition moderne initiale, ou d'héritabilité « transgénérationnelle », d'observation plus récente, et qui fait intervenir une transmission *via* les gamètes. Les mécanismes ou les agents potentiellement impliqués, qu'ils soient épigénétiques ou autres (ARN non codants, facteurs diffusibles ou cytoplasmiques, par exemple) sont différents dans ces deux types d'héritabilité. De plus, bien que certaines marques épigénétiques soient considérées comme généralement stables, des influences environnementales et des événements stochastiques peuvent à l'origine de modifications de ces marques et changer le statut transcriptionnel [33].

Jusqu'à présent, l'attention s'était surtout portée sur les 2 principaux codes épigénétiques, les modifications enzymatiques des histones et la méthylation de l'ADN *(Figure 3)*. Cette dernière est fidèlement reproduite lors de la division, par la méthyltransférase 1 de l'ADN (DNMT1) [34], et peut donc être le support de la mémoire. Cependant, certains organismes comme la drosophile ou le nématode *Caenorhabditis elegans,* n'ont pas d'enzyme permettant la méthylation de l'ADN, mais sont capables, par d'autres mécanismes, d'auto-perpétuer des états d'expression altérés. En revanche, chez tous les eucaryotes, il existe bien une batterie d'enzymes capables d'apporter des modifications posttraductionnelles aux histones. Les systèmes Polycomb/Trithorax, par leur activité méthyltransférase sur les histones, sont également des acteurs importants *(Figure 3)*.

Il existe donc différents processus capables de conserver la mémoire des impacts de l'environnement. Il est probable qu'ils n'agissent pas seuls mais en interaction les uns avec les autres et avec d'autres processus qui restent à découvrir.

Réversibilité des marques ou réversibilité des états phénotypiques ?

Si, par nature, les marques épigénétiques sont malléables donc réversibles, les conséquences de leurs changements sur la morphogenèse ou l'état de la cellule peuvent, elles, être irréversibles. Au cours des périodes critiques de plasticité développementale (préconceptionnelle, gestation, petite enfance et adolescence), un environnement subnormal peut créer une prédisposition irréversible aux facteurs de risque d'une maladie survenant ultérieurement chez l'adulte. Ainsi, une alimentation déséquilibrée de la mère pendant la gestation peut être associée, chez l'enfant, à une diminution du nombre de cellules bêta pancréatiques productrices d'insuline, ou de néphrons, entraînant respectivement un risque de diabète ou d'hypertension (➜). **(➜) Voir page ??? de ce numéro**

Une adversité précoce peut, elle, exposer à un risque de maladie neuro-dégénérative ou de développement tumoral [35-37] (➜). **(➜) Voir page ??? de ce numéro**

La dynamique inhérente aux processus épigénétiques explique l'importante flexibilité des marques en fonction de l'exposition à des facteurs de l'environnement internes et externes [38]. Si certaines, établies lors de l'impact, sont stables, d'autres apparaîtront ou/et disparaîtront, faisant évoluer le paysage épigénétique tout en aggravant ou en corrigeant le phénotype au cours du temps [39] *(Figure 4)*.

Pourtant, à l'inverse des mutations du génome, les multiples épimutations (mutations de l'épigénome) sont, elles, potentiellement réversibles. Les facteurs épigénétiques étalent leurs effets sur la structure de la chromatine sur des échelles de temps variées allant de la minute, au cours de la signalisation par un récepteur, à des années pour la mémoire métabolique, ou à des générations pour les perturbations environnementales [38, 40]. Ainsi, l'ADN subit des cycles de méthylation/déméthylation indiquant qu'une marque « stable » d'activité génique peut toutefois être modulée par des facteurs de transcription et répondre dynamiquement à des signaux de l'environnement [41].

Contrairement à la séquence génétique, unique et stable dans toutes les cellules, les profils épigénétiques varient d'un type cellulaire à l'autre au sein d'un même tissu, voire même de la partie apicale à la partie distale d'un même tissu. Ils sont dynamiques au cours de la vie [42] et des rythmes circadiens [23]. De fait, l'élément central de l'horloge circadienne, le facteur de transcription CLOCK (*clock circadian regulator*), possède également une activité acétyltransférase d'histone et plusieurs modificateurs de la chromatine sont recrutés de manière circadienne au niveau des promoteurs des gènes contrôlés par l'horloge ; des ARN antisens jouent également un rôle important dans cette régulation [43, 62]. Il est maintenant également admis que des processus épigénétiques sous-tendent les états fonctionnels des neurones qui peuvent rester stables pendant plusieurs années.. Toutefois, ces états ne pourront être transmis à des cellules filles, puisqu'à part quelques exceptions, les neurones ne se divisent pas [24, 44].

S'il existe aujourd'hui au moins une vingtaine d'exemples de correction ou de compensation d'effets transmis par la mère qui influençent le phénotype de la progéniture [39, 45], un petit nombre seulement fait état de modifications épigénétiques accompagnant ces

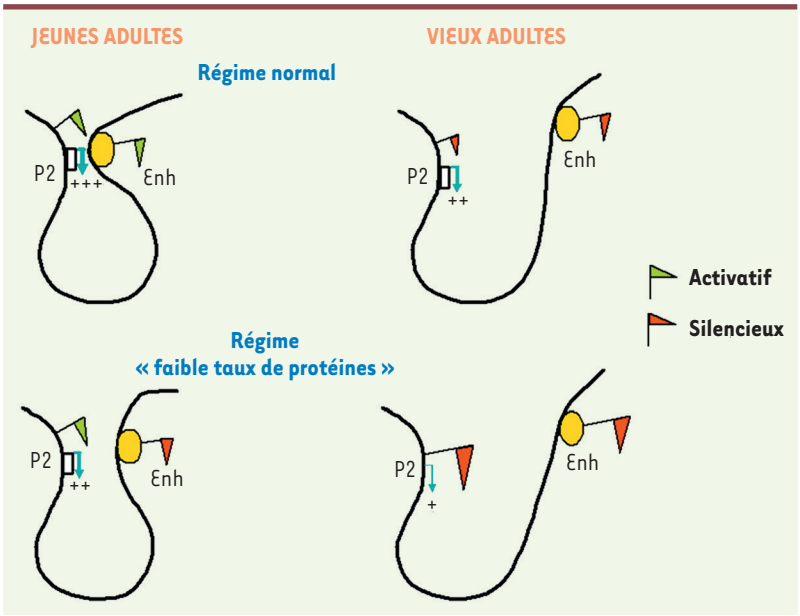


Figure 4. ***La mémoire est dynamique à travers l'espace, boucle, promoteurs, enhancers.*** Modèle simplifié proposé pour la boucle formée par l'association entre l'*enhancer* (activateur transcriptionnel) et le promoteur dans le locus *Hnf4a* (*hepatocyte nuclear factor-4-alpha*) dans les îlots pancréatiques de jeunes et vieux animaux contrôles (C) et dénutris en protéines (LP). Dans les îlots des jeunes rats adultes contrôles, l'*enhancer* est enrichi en marques d'histone actives et interagit étroitement avec le promoteur *Hnf4a P2*, conduisant à des niveaux élevés de transcription de P2. L'interaction de l'*enhancer*-promoteur avec *P2* est altérée dans les îlots des animaux exposés à une alimentation pauvre en protéines au cours du développement précoce. Ceci est dû à l'épuisement en marques d'histones activatrices et à l'enrichissement en marques d'histones inhibitrices au niveau de la région de l'*enhancer*. Le vieillissement est associé à une réduction des niveaux d'expression d'*Hnf4a* en raison de l'enrichissement en marques d'histones inhibitrices le long du locus, et ceci est plus prononcé dans les îlots des animaux LP. L'accumulation de marques d'histones inhibitrices pourrait affaiblir davantage l'interaction de l'*enhancer*-promoteur avec P2. La différence entre les adultes contrôles et les adultes tests dans la figure se manifeste par un écartement de la base de la boucle entre le promoteur et l'*enhancer* qui est déjà marqué entre les jeunes adultes soumis à un régime normal par rapport aux adultes âgés. La différence entre les 2 régimes s'accroît chez les adultes âgés soumis à une exposition précoce au régime pauvre en protéine (d'après [39]).

changements phénotypiques au cours de la vie d'un individu [46-48]. Il n'existe cependant pas encore, à notre connaissance, d'exemple de réversibilité de marques associées à des effets correcteurs ou compensateurs au cours des générations.

Phase 2 : comment l'organisme programmé répond à l'environnement

La seconde phase de la DOHaD correspond aux effets, ou plutôt aux réponses, à moyen et long terme, aux perturbations survenues au cours du développement, auxquelles viennent s'associer celles survenues tout au long de la vie, sous l'influence d'effets permanents et fluctuants de l'environnement *(Figure 1)*.

Le principe des deux événements : effets ou réponses ?

Les altérations épigénétiques survenues au cours du développement sous les effets de l'environnement peuvent être considérées comme un premier événement. Elles ne confèrent qu'un état latent, une sensibilité à un second événement, révélé plus tard par des facteurs de risque environnementaux. Plus qu'un effet causal direct à long terme, il s'agit plutôt de modifications de la capacité de réponse des tissus/organes programmés [36, 37, 49].

Les marques évoluent rapidement au cours du temps [39, 42]. Les changements ultérieurs qui surviennent sous l'effet de différents environnements, ou des modifications liées au vieillissement, peuvent augmenter la charge allostatique c'est-à-dire rendre un individu encore plus susceptible, ou inversement, plus résistant, à leurs effets *(Figure 4)* [39].

La « programmation » précoce peut également conférer à un gène une capacité à répondre plus rapidement à une seconde exposition. Ainsi, le concept de mémoire hépatique suggère qu'un gène (par exemple les gènes codant les récepteurs aux hormones stéroïdes et thyroïdes) peut répondre plus rapidement à un inducteur lors de la deuxième exposition que lors de l'activation initiale, surtout si celle-ci a lieu à un stade où cet inducteur n'est habituellement pas présent, et la mémoire de cette exposition peut être retenue pendant plusieurs mois [50]. Ainsi, cela pourrait expliquer pourquoi certains polluants aux effets hormono-mimétiques (perturbateurs endocriniens) ont des effets avant la différenciation des gonades, donc malgré l'absence d'hormones gonadiques à ce stade (➜).

(➜) Voir page ??? de ce numéro

La mémoire métabolique : peut-on la déverrouiller ?

On ne sait pas si toutes les marques épigénétiques acquises sont réversibles et dans quelles conditions ? Chez l'humain, un des mécanismes les mieux étudiés d'interaction entre un défaut nutritionnel et l'épigénome est la mémoire métabolique ou glycémique, observée chez des patients diabétiques (➜).

Chez ces patients, les complications du diabète causées par l'hyperglycémie transitoire persistent

(➜) Voir le numéro thématique *Diabète : approches thérapeutiques émergentes*, *m/s* n°8-9, août-septembre 2013

voire progressent, alors même que la glycémie est contrôlée par l'administration d'insuline [51]. L'analyse des modifications post-traductionnelles des histones dans des cellules sanguines de patients atteints de diabète de type 1 (DT1) a montré que l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9ac) est modifiée [52]. De façon similaire, *in vitro* dans des cellules endothéliales primaires exposées à une hyperglycémie, cette acétylation de l'histone H3 est diminuée sur un nombre significatif de régions promotrices de gènes impliqués dans la physiopathologie du DT1 [53] .

Ces observations indiquent qu'une exposition à des concentrations élevées de glucose induit des modifications épigénétiques stables qui pourraient expliquer la mémoire métabolique chez l'humain. Compte tenu du caractère réversible des marques épigénétiques, il reste cependant à déterminer pourquoi, et surtout, comment, ces marques sont-elles « verrouillées », puisqu'un retour à une glycémie normale ne les efface pas ?

Dans des cellules mammaires normales, l'exposition aux estrogènes induit la formation transitoire de multiples boucles dans une région du chromosome 16 qui rapprochent 14 locus distants. Les points d'interactions se focalisant sur des sites sensibles aux estrogènes, permettent ainsi une répression coordonnée de ces locus. Cependant dans les cellules mammaires tumorales, l'acquisition d'une méthylation de l'ADN et de modifications post-traductionnelles des histones ayant une action répressive aboutit à un échafaudage inflexible. Du fait de cette perte de flexibilité, la répression induite par les œstrogènes dans les cellules tumorales se trouve renforcée [40].

Ces exemples illustrent la difficulté de trancher entre des marques « causales » et des marques « conséquences » de longs processus physiopathologiques, auxquels s'ajoutent des perturbations environnementales exogènes et endogènes simultanées, liées au vieillissement et au sexe. Cette question, difficilement abordable expérimentalement chez l'homme, peut être abordée dans des modèles animaux appropriés.

Perspectives : quels enjeux pour l'épigénomique environnementale ?

L'augmentation de l'incidence des maladies chroniques à travers le monde représente une préoccupation majeure dans le domaine de la santé. Les nouvelles connaissances sur la DOHaD, en particulier les impacts de l'environnement sur la phase de programmation au cours du développement et ses mécanismes épigénétiques, représentent une opportunité pour combattre ce fléau notamment par la prévention. L'épigénétique contemporaine, moléculaire, est, elle, étudiée depuis plus de 40 ans, 30 ans dans le cadre du cancer. Il reste donc à combler le fossé entre les connaissances et les apports d'une recherche fondamentale de pointe sur l'épigénétique et les besoins d'une recherche appliquée dans le cadre de la DOHaD, à l'animal ou à l'humain. Il faudrait pour cela que l'on étudie les perturbations de l'environnement sur les processus épigénétiques, pendant toutes les phases y compris les phases précoces, ce qui est encore très peu abordé.

La complexité des processus épigénétiques et la variété des facteurs environnementaux nécessitent le développement d'une recherche transdisciplinaire, qui seule permettra d'imaginer de nouvelles approches, de découvrir des mécanismes encore insoupçonnés et de développer des stratégies de prévention adaptées, cohérentes et efficaces chez les sujets à risque.

Quant à la transmission aux générations suivantes, de susceptibilité à des maladies chroniques ou d'une résilience, par le biais de mécanisme(s) épigénétique(s) qui sont encore mal étayés, elle n'est pas encore démontrée très clairement chez l'humain, mais les preuves s'accumulent chez le rongeur, les nématodes, la drosophile et surtout les plantes [54-58]. Jusqu'à présent un nombre important de revues portent sur les effets inter- ou transgénérationnels [15-17, 59]. Or cette phase, pour passionnante qu'elle soit, ne correspond qu'à l'une des trois grandes phases clés de la DOHaD. Si certains caractères sont effectivement transmissibles, le principal défi pour l'individu, et surtout pour les pouvoirs publics, est de pouvoir éviter ces transmissions.

Quoi qu'il en soit, ces données risquent de déplacer le curseur des responsabilités en termes de santé, de la sphère privée vers la sphère socio-géographico-politique et avec de nouvelles questions d'éthique. Cette revue souligne le rôle majeur de l'environnement sur notre santé. Un changement de paradigme s'impose pour passer du traitement, trop tardif, à la prévention. Pour cela une prise de conscience est nécessaire à tous les niveaux pour évaluer les véritables risques et prendre en compte les aspects coût/bénéfice des recommandations préconisées et validées. Compte tenu de l'impact des facteurs socioéconomiques on doit aussi, comme le fait P. O'Campo, s'interroger : *« Apportons-nous les bonnes évidences/preuves scientifiques, qui permettront d'identifier les chainons manquants et d'agir pour enrayer les effets des facteurs environnementaux et des déterminants sociaux de la santé ?»* [60]. ◊

SUMMARY

The new paradigm of the developmental origin of health and diseases (DOHaD) – Epigenetics and environment: evidence and missing links

According to the new paradigm of the Developpemental Origins of Health and Disease (DOHaD), the environmental factors to which an individual is exposed throughout his life can leave an epigenetic footprint on the genome. A crucial period is the early development, where the epigenome is particularly sensitive to the effects of the environment, and during which the individual builds up his health capital that will enable him to respond more or less well to the vagaries of life. The research challenge is to decipher the modes of action and the epigenetic mechanisms put into play by environmental factors that lead to increased disease susceptibility or resilience. The

challenge for health is to translate these scientific discoveries into action through, among others, the establishment of preventive recommendations to slow down the growing incidence of non communicable diseases. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Eskenazi B, Marks AR, Catalano R, *et al.* Low birthweight in New York City and upstate New York following the events of September 11th. *Hum Reprod* 2007 ; 22 : 3013-20.
2. Cao-Lei L, Massart R, Suderman MJ, *et al.* DNA methylation signatures triggered by prenatal maternal stress exposure to a natural disaster: project ice storm. *PLoS One* 2014 ; 9 : e107653.
3. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004 ; 7 : 847-54.
4. McGowan PO, Suderman M, Sasaki A, *et al.* Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. *PLoS One* 2012 ; 6 : e14739.
5. Provencal N, Suderman MJ, Guillemin C, *et al.* Association of childhood chronic physical aggression with a DNA methylation signature in adult human T cells. *PLoS One* 2014 ; 9 : e89839.
6. Suderman M, McGowan PO, Sasaki A, *et al.* Conserved epigenetic sensitivity to early life experience in the rat and human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 Suppl 2 : 17266-72.
7. Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, *et al.* Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci* 2014 ; 17 : 667-9.
8. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, *et al.* Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 2009 ; 12 : 342-8.
9. Szyf M. Lamarck revisited: epigenetic inheritance of ancestral odor fear conditioning. *Nat Neurosci* 2014 ; 17 : 2-4.
10. Jordan B. Épigénétique et résilience. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 325-8.
11. Klengel T, Mehta D, Anacker C, *et al.* Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nat Neurosci* 2013 ; 16 : 33-41.
12. Guillemin C, Provencal N, Suderman M, *et al*. DNA methylation signature of childhood chronic physical aggression in T cells of both men and women. *PLoS One* 2014 ; 9 : e86822.
13. Teh AL, Pan H, Chen L, *et al*. The effect of genotype and *in utero* environment on interindividual variation in neonate DNA methylomes. *Genome Res* 2014 ; 24 : 1064-74.
14. Rando OJ, Verstrepen KJ. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* 2007 ; 128 : 655-68.
15. Meaney MJ, Ferguson-Smith AC. Epigenetic regulation of the neural transcriptome: the meaning of the marks. *Nat Neurosci* 2010 ; 13 : 1313-8.
16. Daxinger L, Whitelaw E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat Rev Genet* 2012 ; 13 : 153-62.
17. Lim JP, Brunet A. Bridging the transgenerational gap with epigenetic memory. *Trends Genet* 2013 ; 29 : 176-86.
18. Gueant JL, Daval JL, Vert P, Nicolas JP. Folates et programmation fœtale : rôle des mécanismes nutrigénomiques et épigénomiques. *Bull Acad Natl Med* 2012 ; 196 : 1829-42.
19. Allis CD, Berger SL, Cote J, *et al.* New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 2007 ; 131 : 633-6.
20. Waddington C. canalisation of development and inheritance of acquired characters. *Nature* 1942 ; 152 : 563.
21. Riggs AD, Xiong Z. Methylation and epigenetic fidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 4-5.
22. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007 ; 447 : 396-8.
23. Orozco-Solis R, Sassone-Corsi P. Epigenetic control and the circadian clock: linking metabolism to neuronal responses. *Neuroscience* 2014 ; 264 : 76-87.
24. Rudenko A, Tsai LH. Epigenetic regulation in memory and cognitive disorders. *Neuroscience* 2014 ; 264 : 51-63.
25. Chi AS, Bernstein BE. Developmental biology. Pluripotent chromatin state. *Science* 2009 ; 323 : 220-1.
26. Graf T, Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature* 2009 ; 462 : 587-94.
27. Junien C, Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS. Épigénomique nutritionnelle du syndrome métabolique. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 396-404.
28. Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 2014 ; 157 : 77-94.
29. Ho SM, Johnson A, Tarapore P, *et al*. Environmental epigenetics and its implication on disease risk and health outcomes. *ILAR J* 2012 ; 53 : 289-305.
30. Junien C, Gabory A, Attig L. Le dimorphisme sexuel au XXIe siècle. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 185-92.
31. Weber M. La méthylation de l'ADN, un acteur-clé de la pluripotence. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 483-5.
32. Ptashne M. Faddish stuff: epigenetics and the inheritance of acquired characteristics. *FASEB J* 2013 ; 27 : 1-2.
33. Branciamore S, Rodin AS, Riggs AD, Rodin SN. Enhanced evolution by stochastically variable modification of epigenetic marks in the early embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 6353-8.
34. Ooi SK, O'Donnell AH, Bestor TH. Mammalian cytosine methylation at a glance. *J Cell Sci* 2009 ; 122 : 2787-91.
35. Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J* 2010 ; 427 : 333-47.
36. Gapp K, Woldemichael BT, Bohacek J, Mansuy IM. Epigenetic regulation in neurodevelopment and neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 2014 ; 264 : 99-111.
37. Kelly-Irving M, Lepage B, Dedieu D, *et al.* Childhood adversity as a risk for cancer: findings from the 1958 British birth cohort study. *BMC Public Health* 2013 ; 13 : 767.
38. Heard E. The dynamics of epigenetic changes in a range of organisms. *Curr Top Dev Biol* 2013 ; 104 : xiii-xv.
39. Ozanne SE, Sandovici I, Constancia M. Maternal diet, aging and diabetes meet at a chromatin loop. *Aging (Albany NY)* 2011 ; 3 : 548-54.
40. Hsu PY, Hsu HK, Singer GA, *et al.* Estrogen-mediated epigenetic repression of large chromosomal regions through DNA looping. *Genome Res* 2010 ; 20 : 733-44.
41. Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, *et al.* Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 2008 ; 452 : 45-50.
42. Pinney SE, Simmons RA. Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2010 ; 21 : 223-9.
43. Xue Z, Ye Q, Anson SR, *et al.* Transcriptional interference by antisense RNA is required for circadian clock function. *Nature* 2014 ; 514 : 650-3.
44. Woldemichael BT, Bohacek J, Gapp K, Mansuy IM. Epigenetics of memory and plasticity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014 ; 122 : *305-40.*
45. Mathias PC, Elmhiri G, de Oliveira JC, *et al*. Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. *Eur J Nutr* 2014 ; 53 : 711-22.
46. Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, *et al.* Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* 2005 ; 25 : 11045-54.
47. Burdge GC, Lillycrop KA, Phillips ES, *et al.* Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J Nutr* 2009 ; 139 : 1054-60.
48. Attig L, Vige A, Gabory A, *et al.* Dietary alleviation of maternal obesity and diabetes: increased resistance to diet-induced obesity transcriptional and epigenetic signatures. *PLoS One* 2013 ; 8 : e66816.
49. Remacle C, Dumortier O, Bol V, *et al.* Intrauterine programming of the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab* 2007 ; 9 (suppl 2) : 196-209.
50. Edinger RS, Mambo E, Evans MI. Estrogen-dependent transcriptional activation and vitellogenin gene memory. *Mol Endocrinol* 1997 ; 11 : 1985-93.
51. Pirola L, Balcerczyk A, Okabe J, El-Osta A. Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. *Nat Rev Endocrinol* 2010 ; 6 : 665-75.
52. Miao F, Chen Z, Genuth S, *et al.* Evaluating the role of epigenetic histone modifications in the metabolic memory of type 1 diabetes. *Diabetes* 2014 ; 63 : 1748-62.
53. Pirola L, Balcerczyk A, Tothill RW, *et al*. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome Res* 2011 ; 21 : 1601-15.
54. Grossniklaus U, Kelly WG, Ferguson-Smith AC, *et al.* Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? *Nat Rev Genet* 2013 ; 14 : 228-35.
55. Sela M, Kloog Y, Rechavi O. Non-coding RNAs as the bridge between epigenetic mechanisms, lineages and domains of life. *J Physiol* 2014 ; 592 : 2369-73.
56. Cuzin F, Rassoulzadegan M. Non-Mendelian epigenetic heredity: gametic RNAs as epigenetic regulators and transgenerational signals. *Essays Biochem* 2010 ; 48 : 101-6.
57. Rechavi O, Houri-Ze'evi L, Anava S, *et al*. Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell* 2014 ; 158 : 277-87.
58. Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 2014 ; 157 : 95-109.
59. Ferguson-Smith AC, Patti ME. You are what your dad ate. *Cell Metab* 2011 ; 13 : 115-7.
60. O'Campo P. Are we producing the right kind of actionable evidence for the social determinants of health? *J Urban Health* 2012 ; 89 : 881-93.
61. Lange UC, Schneider R. What an epigenome remembers. *Bioessays* 2010 ; 32 : 659-68.
62. Dardente H. Redondance génétique et synchronisation cellulaire dans les horloges circadiennes. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 270-6.

TIRÉS À PART

C. Junien

médecine/sciences 2015 ; 32 : 000-00

Épigénétique et réponses transgénérationnelles aux impacts de l'environnement

Des faits aux lacunes

Claudine Junien[1], Polina Panchenko[1], Sara Fneich[1], Luciano Pirola[2], Sabrina Chriett[2], Valérie Amarger[3], Bertrand Kaeffer[3], Patricia Parnet[3], Jérome Torrisani[4], Francisco Bolaños Jimenez[3], Hélène Jammes[1], Anne Gabory[1]

> L'existence de mécanismes non génétiques, non culturels, assurant le transfert de la mémoire de l'exposition à divers environnements des parents et conditionnant la réactivité des générations suivantes à divers environnements au cours de leur vie suscite un intérêt grandissant. Pourtant des questions fondamentales demeurent quant à la nature, aux rôles et à l'impact respectif, des marques et mécanismes épigénétiques, des ARN non codants ou d'autres mécanismes et à leur persistance au fil des générations. Un modèle intégrant ces différents systèmes de transmission, leurs interactions avec l'environnement ainsi que les fenêtres de sensibilité en fonction du sexe du parent et de l'enfant, reste à construire. <

[1] Inra, UMR1198, biologie du développement et reproduction, Domaine de Vilvert, Bâtiment 230, F-78350 Jouy-en-Josas, France ;
[2] Institut Carmen, Inserm U1060, Oullins, France ;
[3] Inra, UMR 1280, université de Nantes, Institut des maladies de l'appareil digestif, F-44000 Nantes, France ;
[4] Inserm UMR1037, Centre de recherches en cancérologie de Toulouse, Université de Toulouse III Paul Sabatier, F-31037 Toulouse, France.
claudine.junien@jouy.inra.fr

Les théories de J.B. Lamarck revisitées à la lumière de l'épigénétique

Notre capacité à répondre aux différents défis et aléas de la vie, aux facteurs de stress et au risque de maladie, pendant l'enfance et au cours de la vie adulte dépend du capital santé et du capital humain [1] dont nous sommes dotés à la naissance [59] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de C. Junien *et al.*, page ??? de ce numéro

Les notions selon lesquelles des mécanismes non génétiques et non culturels peuvent transmettre la mémoire des expositions à divers environnements et conditionner les réactions des générations suivantes, sont à la base du concept des origines développementales de la santé et des maladies (DOHaD) et suscitent un intérêt grandissant [2]. Elles remettent au goût du jour les propositions de J.B. Lamarck, longtemps décriées (voir *Encadré*). Les impacts environnementaux liés à l'alimentation, au stress, aux produits chimiques, ou à d'autres influences psychoaffectives, géographiques, politiques ou socio-économiques peuvent affecter trois générations, voire plus : la mère et le père (F0), leurs enfants (F1), et leurs petits enfants (F2) par des changements aux niveaux somatique et/ou germinal de la génération F1 (Figure 1) [59] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de C. Junien *et al.*, page ??? de ce numéro

Les expériences auxquelles l'individu est exposé *in utero* et au cours des 2 premières années (concept des 1 000 jours) représentent un indéniable déterminant de son capital santé. Mais les phases qui précèdent la conception, à commencer par la gamétogenèse, en distinguant les effets sur les cellules germinales primordiales et les gamètes, sont également importantes et doivent être considérées.

Le principal défi est d'identifier les messagers de cette information environnementale qui peut être transférée d'une génération à l'autre. Les principales pistes convergent vers certaines régions de l'ADN (gènes, séquences répétées, etc.) dont les marques épigénétiques pourraient – au moins partiellement – échapper aux phases successives de reprogrammation. Une hypothèse, à valider, serait que ces régions pourraient véhiculer/porter des changements persistants de la conformation de la chromatine consécutifs aux impacts de l'environnement. Enfin, la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones ne représentent probablement pas à elles seules toutes les bases moléculaires des mécanismes

Le haut-relief placé à l'arrière du socle représente Jean-Baptiste Lamarck et sa fille Aménaïde Cornélie (on peut y lire : « *La postérité vous admirera, elle vous vengera, mon père* »)

Le biologiste/zoologiste et anatomiste français Jean-Baptiste Pierre Antoine de Mont, chevalier de Lamarck (1774-1829), a grandement contribué à la classification des formes de vie, en proposant quatre lois :
« Première loi : La vie par ses propres forces, tend continuellement à accroître le volume de tout corps qui la possède et à étendre les dimensions de ses parties jusqu'à un terme qu'elle amène elle-même.
Deuxième loi : La production d'un nouvel organe dans un corps animal résulte d'un nouveau besoin survenu qui continue de se faire sentir et d'un nouveau mouvement que ce besoin fait naître et entretient.
Troisième loi : Le développement des organes et leur force d'action sont constamment en raison de l'emploi de ces organes.
Quatrième loi : Tout ce qui a été acquis, tracé ou changé, dans l'organisation des individus, pendant le cours de leur vie, est conservé par la génération, et transmis aux nouveaux individus qui proviennent de ceux qui ont éprouvé ces changements ».
Les processus de transmission non génétiques ont souvent été qualifiés de Lamarckien puisqu'ils évoquent la possibilité d'hériter de caractères acquis de la (des) génération(s) précédente(s). Cependant les preuves de l'implication de processus épigénétiques pour rendre compte d'une évolution Lamarckienne sont encore tenues ou parcellaires.
Formulée il y a deux siècles, sa quatrième loi pourrait sembler en désaccord avec le fait qu'après la fécondation l'effacement intensif des marques épigénétiques portées par les gamètes pour laisser place à la totipotence ne devrait pas laisser passer d'information sur le vécu des parents, voire des ancêtres. Pourtant Lamarck partait de la notion qu'un changement de l'environnement provoque des changements dans les besoins des organismes vivants dans ce milieu, ce qui provoque à son tour des changements dans leur comportement. Cette modification du comportement entraîne une utilisation plus ou moins importante d'un organe donné et déterminerait, en conséquence, la taille de cet organe au fil du temps sur plusieurs générations, son augmentation ou sa disparition.

épigénétiques. Le rôle des ARN non codants (petits et longs) s'affirme [2]. Par ailleurs, de nouveaux vecteurs (comme les exosomes, les prions, les métabolites, des pathogènes, des substances chimiques ou le microbiote maternel) pourraient être impliqués dans la transmission d'informations épigénétiques et non épigénétiques résultant des impacts de l'environnement [3].

Réponses transgénérationnelles à une programmation : cercle vicieux ou résilience ?

La programmation qui apparaît sous l'influence de l'environnement au cours du développement, ou qui est héritée des parents, peut être considérée comme un « premier événement ». Souvent, elle ne confère qu'un état latent, une sensibilité à un « second événement » révélée plus tard, du fait de l'accumulation des facteurs de risques environnementaux qui entraîne un changement de seuil. Cette programmation n'induit pas à proprement parler d'effets à long terme, mais tout ce qui conditionne la capacité de « réponse » (augmentée ou diminuée) des tissus/organes programmés, déterminant une vulnérabilité ou une résilience au développement de la maladie. Le tout dépendant également du fond génétique, tout au long de ces processus.

La majorité des études phénotypiques se sont limitées à l'exploration du système perturbé par l'exposition parentale/ancestrale, comme le métabolisme pour les expositions nutritionnelles (➜), ou le comportement pour l'exposition au stress [58]. Pourtant, selon le l'intensité et la durée de l'exposition mais aussi le(s) stade(s) de développement auxquels cette exposition a eu lieu, les perturbations peuvent affecter différents systèmes physiologiques, voire tous. Ainsi une exposition paternelle au stress a révélé non seulement des troubles du comportement, mais aussi des troubles métaboliques, chez les descendants [4]. Dans les modèles animaux, le phénotypage des descendants ne prête généralement qu'aux effets délétères, ignorant ainsi la part non négligeable de sujets « résistants » mieux adaptés à l'environnement post natal. De plus l'exposition des parents/grands parents pourrait aussi contribuer à une meilleure capacité d'adaptation [5, 6]. Pourtant, des études sur la drosophile ou le ver *Caenorabditis elegans* montrent qu'il existe bien dans certains cas une capacité d'adaptation, une résilience. La programmation peut conférer à des réseaux de gènes une capacité à répondre plus rapidement à un défi de l'environnement [59] (➜).

(➜) Voir page ??? de ce numéro

De manière inattendue, il est également possible de constater dans la descendance des réponses différentes de celles observées sur le parent exposé. Ainsi, dans la cohorte d'Overkalix[1], une malnutrition masculine chez le père, avant l'adolescence, se traduit par un risque plus faible de mortalité cardiovasculaire deux générations plus tard [5]. De plus, des environnements enrichis qui favorisent l'activité physique et cérébrale de l'animal, peuvent aussi induire des réponses transgénérationnelles favorables, qu'il s'agisse de performances meilleures, ou une réponse protectrice ou compensatrice dans le cas d'une programmation dans des conditions défavorables [7]. Enfin, il ne faut pas non plus négliger les interactions sensorielles entre le père et la mère et entre les petits et leur mère [8-10]. Les réponses de la descendance peuvent donc être variées

(➜) Voir la Synthèse de C. Junien *et al.*, page ??? de ce numéro

[1] Cohorte totalisant 320 individus nés en 1890, 1905 et 1920 dans la paroisse d'Overkalix, dans le nord de la Suède.

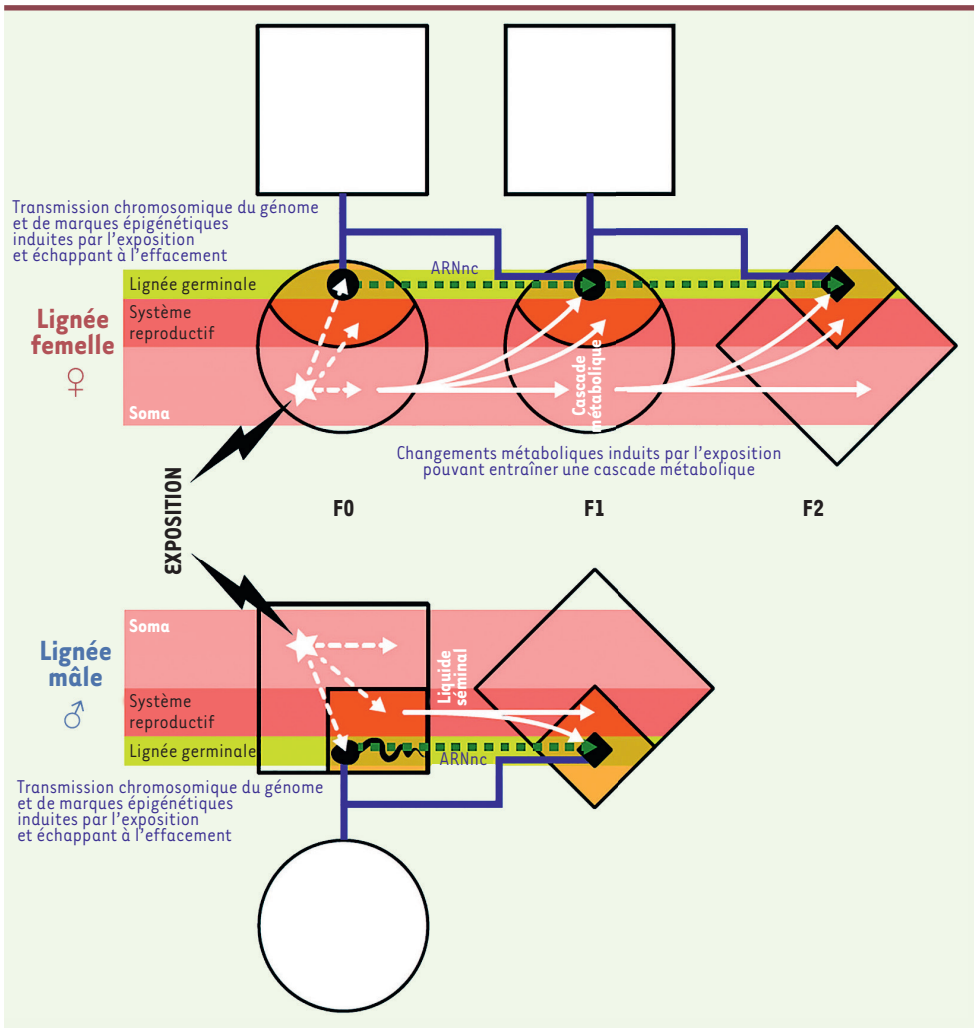


Figure 1. ***Différentes voies selon le sexe de transmission de la mémoire des expositions à l'environnement aux générations suivantes.*** L'exposition à un facteur délétère/bénéfique peut potentiellement affecter la lignée germinale, le système reproducteur et les tissus somatiques. Les lignes généalogiques traditionnelles (bleu) montrent la transmission chromosomique de la mère (à droite) et du père (à gauche). En plus de l'ADN, la lignée germinale transmet des marques épigénétiques dont certaines ont été induites par une exposition, et qui échappent à l'effacement global lors de la reprogrammation, ainsi que des ARN non-codants (ARNnc). Les deux pouvant avoir un impact sur la programmation de la progéniture. L'exposition peut également induire des changements métaboliques dans l'appareil reproducteur des deux parents et influencer ainsi le développement précoce de la progéniture. La transmission de la mère à l'enfant passe également par l'intermédiaire du placenta, dans le cas de changements métaboliques, et de l'influence du microbiome de la mère sur celui de son enfant (d'après [13]).

et différentes des effets de l'impact initial sur le parent, allant du cercle vicieux, ce qui a été le plus souvent décrit, à l'adaptation, qui ouvre d'autres voies.

Dimorphisme sexuel de l'héritabilité non génétique

L'étude de la régulation et de l'expression des gènes, des marques épigénétiques et des enzymes qui les apposent (machinerie épigénétique) ou les enlèvent, des facteurs de transcription ainsi que des complexes chromatiniens associés a révélé, chez l'homme et dans les modèles animaux, l'existence de mécanismes d'adaptation à l'environnement différents chez la femelle et le mâle [10-15]. Les effets/réponses à une programmation peuvent affecter la progéniture des deux sexes, ou de façon prédominante l'un des deux [6, 16, 17]. De plus, selon la nature, la fenêtre, et la durée d'exposition à un environnement, le sexe du parent transmetteur conditionne également la réponse à l'environnement de la progéniture. Après exposition à des toxiques, à l'alcool, à une sur- ou sous-nutrition, au cours d'une fenêtre développementale précise ou après sevrage, certaines caractéristiques phénotypiques peuvent être héritées *via* la voie paternelle seule, ou maternelle seule ou indifféremment *via* les deux [10, 18, 19]. Une bonne illustration de ces différences est apportée par la cohorte d'Overkalix. Les risques de maladie cardiovasculaire et de diabète, chez un homme ou chez une femme, dépendent de l'abondance ou de la restriction de nourriture avant la puberté chez les grands-parents, mais uniquement chez les grands-parents paternels [12]. L'information est transmise par la grand-mère paternelle à ses petites-filles, mais pas à ses petits-fils. Inversement, l'information transmise par le grand-père paternel affecte ses petits-fils, mais pas ses petites-filles. Des données analogues ont été observées chez les rongeurs. Dans le cas d'une consommation de noix de Betel (ou noix d'arec) par le père, on observe une intolérance au glucose chez les descendants mâles. De même, dans le cas

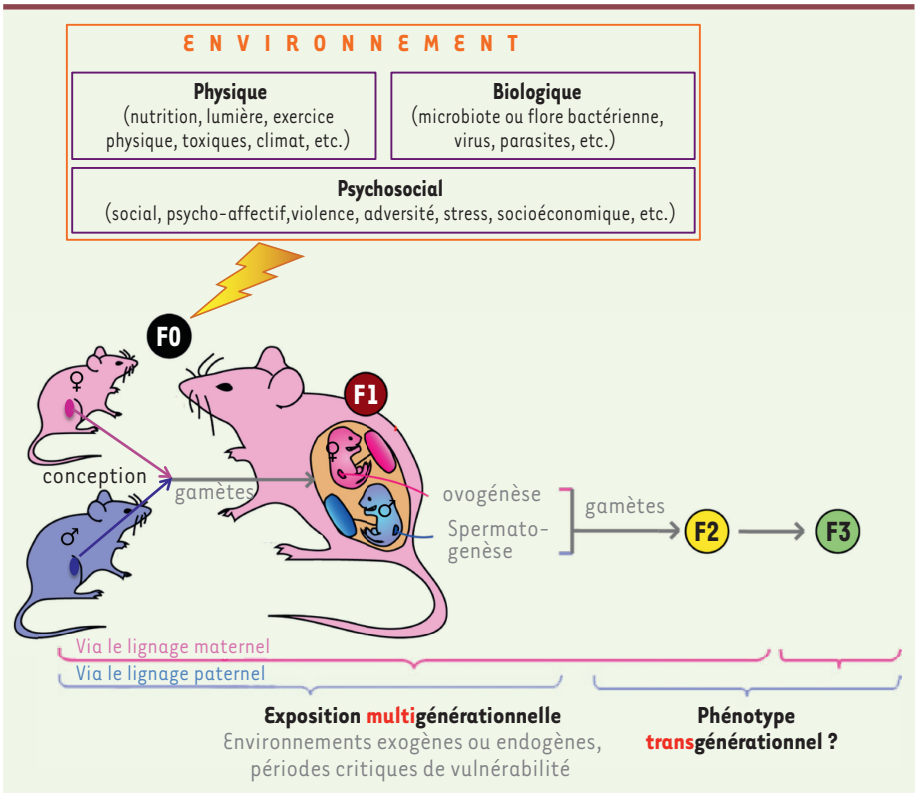


Figure 2. ***La transmission inter ou transgénérationnelle des expositions à l'environnement diffère en fonction du sexe des parents et des descendants.*** Les facteurs de l'environnement impactent l'individu F0, modifiant l'épigénome et les réseaux de gènes de façon spécifique au sexe. Cette exposition peut modifier les gamètes différemment dans les ovocytes et le sperme, et être transmise à la génération suivante (F1). De plus, l'exposition de la mère F0 au cours de la gestation peut être transmise de façon transplacentaire au fœtus F1 en développement. Cette double programmation des tissus somatiques influence la santé de la F1 à long terme. Par ailleurs, les cellules germinales se forment chez la F1 pendant le développement. Ainsi l'environnement de la mère F0 au cours du développement peut affecter directement l'information épigénétique de la génération F2. De ce fait, les lignages paternels et maternels influencent différemment la transmission entre générations. Une exposition multigénérationnelle est observée sur la F0, F1 et F2 en cas d'exposition de la mère alors qu'elle s'exerce sur la F0 et la F1 en cas d'exposition paternelle. Les effets transgénérationnels à proprement parler, méiotiques, sont donc visibles à partir de la F3 dans le lignage maternel et dès la F2 pour le lignage paternel. Mais il est également possible que les phénotypes induits s'estompent au fil des générations (d'après [56]).

d'une sous-nutrition du père avant la gestation où on observe également une intolérance au glucose à la fois chez le père et ses descendants mâles [10, 20]. Dans ce dernier cas on observe dans le sperme du père et de ses descendants mâles une altération de la méthylation dans la région 5'UTR du gène LXRA (*liver X receptor alpha*). On observe également, chez des souris génétiquement identiques mais phénotypiquement variables sur le plan comportemental, une transmission par le père de ses caractéristiques comportementales à sa descendance femelle, mais pas à sa descendance mâle [21].

L'exposition à certains environnements nutritionnels, toxiques ou psychoaffectifs peut affecter la lignée germinale du père ou de la mère (ou des deux), l'ensemble de leurs tissus somatiques, ainsi que leur système reproductif, le milieu et le tractus génital, laissant envisager un dialogue complexe entre ces différents voies ou systèmes et permettant un éventuel transfert concerté par plusieurs de ces voies ou systèmes aux générations suivantes [9, 12, 13, 22] *(Figure 1)*. En fonction du sexe, la lignée germinale et les gamètes montrent des différences génétiques (XX ou XY) ainsi que des différences ontogéniques, morphologiques et fonctionnelles. Ces dernières reposent sur une asymétrie épigénétique qui se prolonge même après la fécondation [23, 24]. À la conception, les gamètes délivrent le patrimoine génétique, l'ADN, pour former le génome de l'embryon, ainsi que des épigénomes et des ARN paternels et maternels différents, des protéines et des mitochondries uniquement maternelles. Donc, outre l'héritage génétique, ils apportent des informations supplémentaires – épigénétiques, protéiques, métaboliques – associées aux expositions antérieures des parents à des facteurs environnementaux, aux expériences, à l'état physiopathologique, à l'âge, à la classe sociale, à l'éducation, mais aussi au rang et au poids de naissance des petits [10, 25].

Si les transmissions maternelles ont été traditionnellement les plus étudiées, elles concernent surtout des réponses inter- ou multigénérationnelles au cours de la gestation/lactation sur le développement et la croissance de l'embryon/fœtus *(Figure 2)*. De multiples conditions physiologiques maternelles, qui n'impliquent pas nécessairement la lignée germinale, ont été étudiées : troubles métaboliques, nutrition, exposition aux toxiques ou stress, ou le libre choix de s'accoupler avec des mâles attractifs [3, 26-31]. Bien que des transmissions épigénétiques par la lignée maternelle aient été démontrées chez des rongeurs [32-34], il est habituellement difficile de distinguer ce qui est hérité par la lignée germinale de ce qui est transmis au cours de la gestation. En revanche, les études sur les transmissions

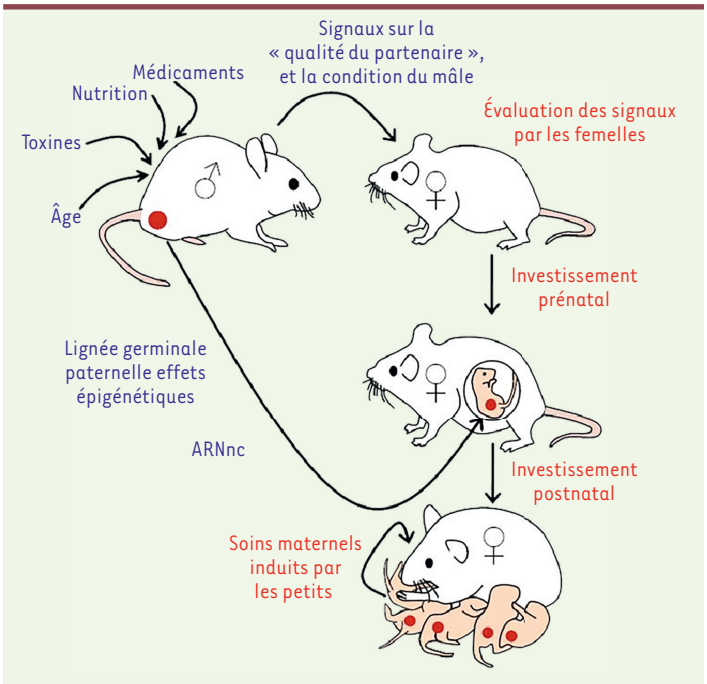


Figure 3. ***La mémoire des expositions paternelles peut perturber le développement de la progéniture par le biais de différentes voies non génomiques.*** Les expériences des mâles (médicaments, drogues, nutrition, toxines, stress, âge), et particulièrement celles subies au cours du développement précoce peuvent entraîner des altérations épigénétiques dans la lignée germinale mâle (point rouge). Ces altérations seront ensuite transmises à la progéniture avec des conséquences en termes de variations phénotypiques. De plus, il est possible que les expériences d'un mâle avant l'accouplement puissent conduire à des changements dans la qualité ou la préférence du partenaire évaluées par la femelle au moment de l'accouplement. Cette évaluation peut avoir pour conséquence des différences au niveau de l'investissement maternel en période pré- et/ou postnatale, se traduisant éventuellement par des caractéristiques phénotypiques de la progéniture, lesquelles peuvent servir à améliorer la transmission des expositions paternelles ou au contraire compenser des déficits de fonctionnement induits par ces expériences. D'après [11].

paternelles, bien que plus rares, ont permis d'aborder la question des mécanismes de passage de l'information par les spermatozoïdes, *via* des marques au niveau de l'épigénome, des ARN non codants, ou par le liquide séminal [9, 10, 12, 25]. Il est également possible que les phénotypes induits s'estompent au fil des générations *(Figure 3)*.

Les différentes phases de reprogrammation et les entorses à l'effacement des marques

Deux phases principales de reprogrammation, en particulier d'effacement des marques parentales, ont surtout été étudiées : l'une se met en place dans le zygote, juste après la fécondation et l'autre concerne la lignée germinale au moment de la migration des cellules primordiales germinales vers les crêtes génitales avant la différenciation sexuelle *(Figure 4A)* [35]. La reprogrammation des génomes parentaux chez le zygote a longtemps été considérée comme quasi complète. Cependant, les marques d'histones et de méthylation de l'ADN de certaines séquences d'ADN peuvent échapper à cet effacement [36]. Deux autres phases pourraient également être assimilées à un processus de reprogrammation. Ainsi, la compaction finale de la chromatine du spermatozoïde, liée au remplacement d'une large proportion d'histones par des protamines, pourrait constituer une troisième phase *(Figure 4B)* [37]. Enfin, à un stade plus tardif de la vie de l'individu, une quatrième phase de reprogrammation apparaît. Celle-ci concernerait les changements massifs, en particulier dans la réorganisation du cerveau et sa maturation, au moment de la puberté. Bien que cette dernière phase puisse être exposée à des facteurs environnementaux complètement différents de ceux qui agissent sur les trois premières phases, elle demeure une étape critique qui nécessite la mise en place de mécanismes complexes de maturation. Cette phase de reprogrammation commence seulement à faire l'objet d'études détaillées au niveau épigénomique (pour revue [38]).

La phase de reprogrammation après la fécondation qui consiste en l'effacement des marques épigénétiques spécifiques portées par les gamètes parentaux, entraîne l'acquisition d'un épigénome totipotent, permettant au zygote et aux premiers blastomères de l'embryon de se différencier en n'importe quel type cellulaire. Certaines séquences, comme les gènes soumis à empreinte parentale, échappent à ce processus *(Figure 4A)*. À la suite de la seconde phase de reprogrammation restreinte à la lignée germinale, la reméthylation de l'ADN qui a lieu après la détermination du sexe permet d'acquérir un programme d'expression de gènes très spécifique y compris celle des gènes soumis à empreinte parentale, pour assurer la différentiation en gamètes *(Figure 4A)*. En raison de l'asymétrie épigénétique des gamètes du père et de la mère, les marques sensibles et non effacées pourraient être différentes dans le zygote selon qu'il s'agit des chromosomes d'origine paternelle ou maternelle. Ceci pourrait conduire à des possibilités différentes de transmission entre les deux sexes [39] *(Figure 4B)*.

Grâce à un effacement incomplet de quelques marques épigénétiques parentales – méthylation de l'ADN et marques des histones – et aux rôles joués par des modificateurs des marques, comme les systèmes polycomb et trithorax[2], la programmation et la transmission

[2] Ces complexes de protéines interviennent dans le maintien de l'expression des gènes. Certaines ont des activités enzymatiques modifiant les marques des histones.

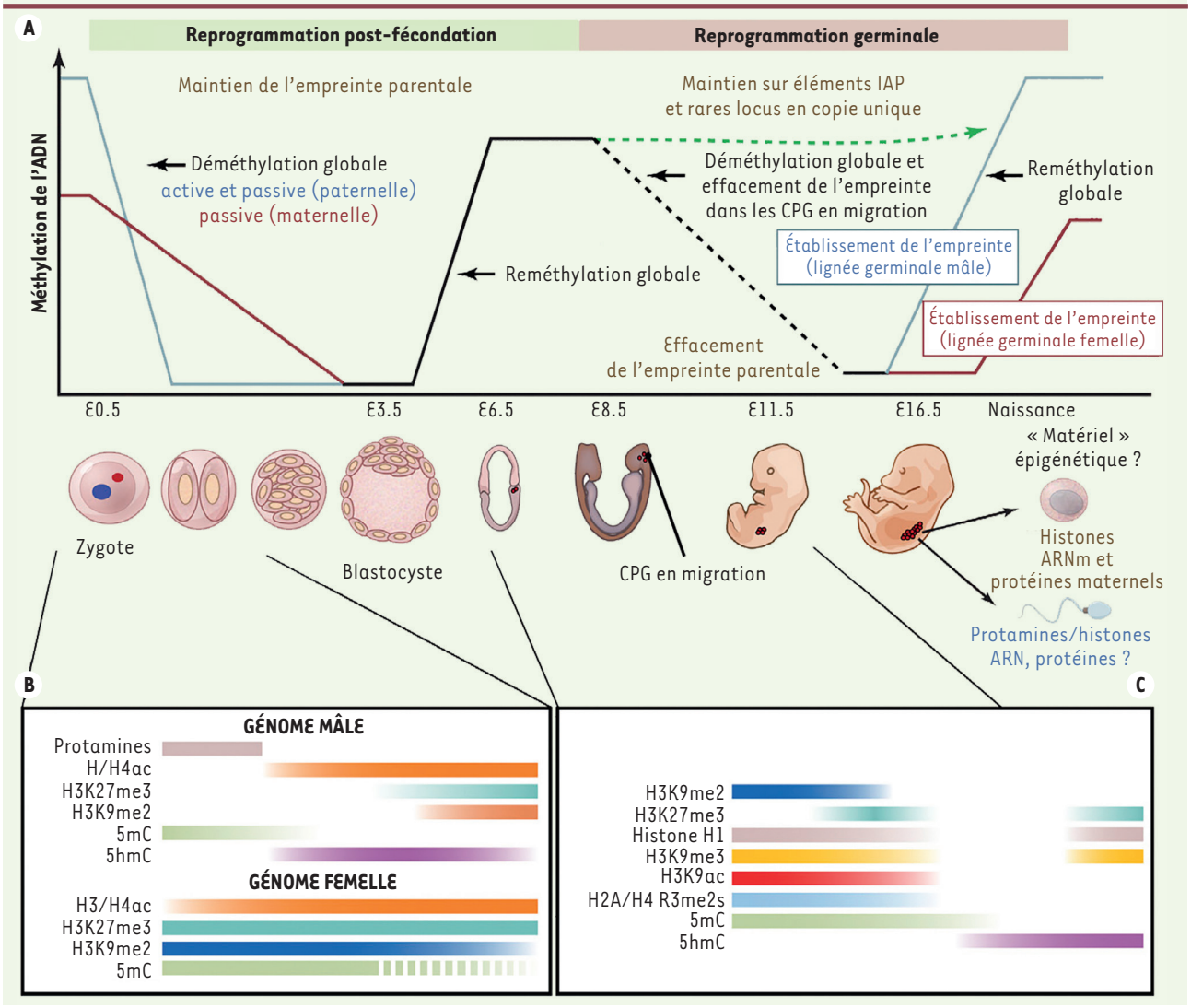


Figure 4. ***Changements épigénétiques pendant les phases de reprogrammation*** **in vivo.** ***A.*** Après la fécondation, le génome paternel (ligne bleue) est déméthylé rapidement par des mécanismes actifs, tandis que le génome maternel (ligne rouge) est déméthylé de façon passive. Les régions différentiellement méthylées (DMR) associées aux gènes soumis à empreinte sont protégées contre cet effacement (ligne verte en pointillés). La méthylation de novo se produit après l'implantation (ligne noire), mais les cellules germinales primordiales ne sont pas spécifiées jusqu'au stade de l'épiblaste (ombrage au haut de la figure). Cette méthylation doit être réinitialisée dans les CPG (cellules germinales primordiales). Depuis le stade e6.5, la figure montre la dynamique de la méthylation dans les cellules qui forment la lignée germinale seulement. La plupart des séquences sont déméthylées dans les CPG autour du stade e9.5. Un sous-ensemble de séquences sont déméthylées tardivement et ne sont reprogrammées qu'après la migration des CPG. Ceux-ci comprennent, mais ne sont pas limités aux DMR des gènes soumis à empreinte. Les séquences répétées de type IAP (*intracisternal A particules*) sont résistantes à la déméthylation à la fois après la fécondation et les vagues de reprogrammation des CPG. Les ilots CpG (CGIs) effacés de manière variable (CVE) peuvent résister à l'effacement lors de la reprogrammation des CPG mais leur statut de méthylation au cours post-fécondation reprogrammation n'est pas clair. Après la détermination du sexe, la méthylation de novo des cellules germinales se produit, mais la dynamique de ces processus est spécifique du sexe. La méthylation est complète au stade prospermatogonie avant la naissance, tandis que la méthylation des ovocytes est établie au cours de la phase de croissance, après la naissance. À l'âge adulte, les gamètes sont méthylés de façon appropriée pour former un nouveau zygote et redémarrer le cycle de la dynamique de méthylation. Le bas de la figure montre les fenêtres de développement examinées par trois études clés indiquant les temps étudiés. D'après [36]. ***B.*** Représentation schématique des modifications globales de méthylation de l'ADN et des histones qui aboutissent à l'activation transcriptionnelle du génome embryonnaire entre le stade zygotique et le stade 2 cellules. Le génome des gamètes subit différents programmes épigénétiques après la fécondation, le génome paternel étant sujet au remodelage principalement au stade zygotique, et le génome maternel perdant progressivement les modifications répressives au cours des divisions suivantes (d'après [57]). ***C.*** Changements épigénétiques globaux au cours du développement de la lignée germinale spécifique avec une spécification des CPG (E6.5) jusqu'à l'arrêt mitotique/méiotique à E13.5. On distingue 2 grandes phases de reprogrammation pendant la migration des CPG vers les crêtes génitales (E7.5–E10.5) et au moment de leur arrivée dans les gonades (E10.5–E12.5) (d'après [57)].

transgénérationnelle des impacts de l'environnement pourraient être assurées [36, 40]. Ces régions de l'ADN qui échappent à l'effacement représentent donc des candidats privilégiés pour véhiculer des informations induites par l'environnement. Pourraient-elles ensuite, en fonction du chromosome, et en particulier si l'Y et/ou l'X comprennent des régions de ce type, expliquer des différences d'atteinte de la progéniture selon son sexe ? La principale difficulté tient au fait que les mécanismes épigénétiques en jeu sont dynamiques et labiles face aux variations de l'environnement, et reposent sur de multiples voies partiellement redondantes, potentiellement synergiques, répressives et/ou activatrices, et dépendantes du contexte [41, 42]. Ceci implique que, si des impacts environnementaux ayant touché les parents plusieurs années avant la conception de l'enfant, affectent précisément ce type de régions réfractaires à l'effacement [3, 12, 13, 43], ils pourraient être à l'origine de réponses transgénérationnelles chez la descendance.

Cependant, pour des raisons probablement techniques, potentiellement liées à la composition en variants d'histone, les séquences en cause varient selon les études. Les nucléosomes retenus, où les histones ne sont pas remplacées par des protamines, peuvent être situés principalement au niveau de gènes critiques pour le développement précoce ou plus tardif [44] au niveau de séquences régulatrices, promoteurs, enhanceurs etc. mais également au niveau de séquences répétées, pauvres en gènes [45]. Quoiqu'il en soit, ces séquences représentent des candidats potentiels pour l'hérédité épigénétique.

Ces mystérieux intermédiaires qui passent le relais de génération en génération

Au moment de la fécondation, chez l'humain comme chez la souris, le nombre de sites méthylés sur l'ADN est beaucoup plus important dans le spermatozoïde que dans l'ovocyte [46]. Une déméthylation étendue, mais spécifique de site, se produit dans le pronoyau mâle et dans le pronoyau femelle après la fécondation, selon des mécanismes actifs et passifs différents, en fonction de l'origine parentale du chromosome [46]. Il était communément admis que seuls les gènes soumis à empreinte parentale échappaient à ce processus de déméthylation. Mais une étude récente montre que, chez la souris, d'autres gènes sont aussi résistants [47]. Dans ce modèle murin de sous-nutrition de la grand-mère (F0), on observe une perturbation du méthylome de l'ADN des spermatozoïdes du père (F1) au niveau de régions différentiellement méthylées (DMR, *differentially methylated regions*) ; ces altérations sont associées à des effets sur le métabolisme de sa descendance sans qu'il y ait de preuves quant à leur causalité (F2) [47]. De façon intéressante, 43 % des DMR hypométhylés en F1 persistent en F2 et ont ainsi le potentiel d'affecter le développement de cette génération. Les régions hypométhylées sont situées, en particulier, au niveau de gènes exprimés dans la lignée germinale, mais aussi de gènes de tissus somatiques. Pourtant, bien que cette méthylation différentielle soit perdue chez la F2 en fin de gestation, des différences importantes persistent dans l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme et situés au voisinage de ces régions. Il est donc improbable que ces changements d'expression soient directement sous le contrôle de la méthylation de l'ADN [47]. Un processus analogue a été observé dans la descendance (F2) de souris femelles rendues obèses par un régime [48]. Ces exemples montrent que les altérations des profils épigénétiques observées tôt au cours du développement pourraient être relayées ensuite par d'autres types d'altérations sur d'autres entités. Ces dernières n'ont pas encore été identifiées. Dans le modèle de la résistance à l'addiction à la cocaïne, la même marque (acétylation de l'histone H3) au niveau du promoteur du même gène (*Bdnf, brain derived neurotrophic factor*) a pu être observée dans les spermatozoïdes du père et dans le cortex préfrontal de sa progéniture mâle résistante à l'addiction [49] (➜).

(➜) Voir également la série *Addictions*, *m/s* 2015, vol. 31

L'acétylation des histones étant une marque associée à l'expression d'un gène, cette observation ne prouve pas qu'il s'agisse du mécanisme responsable du transfert de l'information. Les deux exemples ci-dessus n'excluent en aucun cas le rôle d'un processus épigénétique. Les marques épigénétiques pertinentes et/ou causales n'ont probablement pas encore été étudiées ou pas aux stades adéquats. Compte tenu des dialogues entre les marques, il serait étonnant qu'un seul type de marque soit en cause et que des processus surajoutés, autres qu'épigénétiques, ne puissent être impliqués. De telles associations sont-elles la cause ou une simple conséquence de la dynamique des marques ? Ainsi la question à résoudre demeure bien celle du véritable lien de causalité entre des marques épigénétiques et les phénotypes observés.

Les ARN non codants

Au cours de la fécondation, un spermatozoïde n'apporte pas seulement un génome haploïde paternel mais il libère aussi 24 000 ARN non codants (ncARN : siARN [*short interfering*], piARN [*piwi interacting*], miARN [*micro*]) dans l'ovocyte. Le rôle de ces ARN provenant du spermatozoïde, dans la transmission de caractères acquis, a été bien décrit chez le rongeur. En particulier, différentes études ont montré que la micro-injection d'ARN spermatiques d'animaux est responsable de la transmission des informations phénotypiques du père à la descendance, tels que des altérations métaboliques ou certains comportements [4, 26, 32, 34, 50-52].

Un rapport récent suggère que des ARN isolés du sperme peuvent informer la progéniture d'une histoire de traumatisme précoce dans la vie du père (stress de la grand mère paternelle), avec une persistance des effets/réponses à la troisième génération [4]. Mais à nouveau,

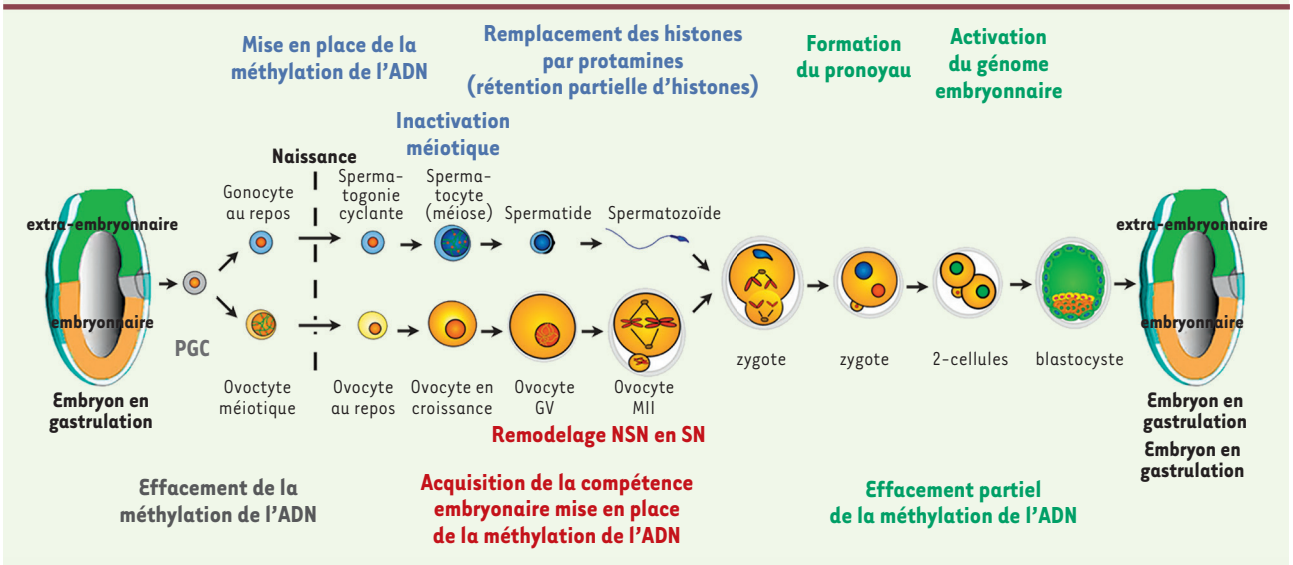


Figure 5. ***La gamétogenèse et l'embryogenèse au cours du cycle de la vie chez les mammifères.*** Les cellules germinales primordiales (PGC) proviennent des cellules épiblastiques proximales et subissent un effacement drastique de la méthylation de l'ADN et des modifications de la chromatine lors de la migration vers les crêtes génitales et lors de l'entrée. Orchestrées par l'environnement somatique gonadique, les cellules germinales s'engagent vers une destinée drastiquement différente soit mâle soit femelle en fonction du sexe génétique XX ou XY. Les cellules germinales mâles, initialement appelées gonocytes, sont en arrêt dans le cycle Les cellules germinales mâles, initialement appelées spermatogonies, sont en arrêt dans le cycle cellulaire. L'établissement profils de méthylation d'ADN spécifiques du mâle est progressive et acquise au stade spermatides. Au cours de la prophase de la méiose qui suit, l'inactivation méiotique des chromosomes sexuels X et Y est caractérisée par des événements majeurs de remodelage. Après les divisions méiotiques, les spermatides haploïdes subissent de vastes changements morphologiques et au niveau du noyau. Pour des raisons de contraintes spatiales, la chromatine du spermatozoïde doit être compactée au maximum. Dans ce but, au cours de la différenciation finale de la spermiogénèse, les histones canoniques sont largement remplacées par des protamines. Bien que la résistance au remplacement varie selon l'espèce, 1 % à 15 % chez la souris, l'humain et le bovin, les critères de remplacement sont conservés au cours de l'évolution, en faveur d'un rôle dans la transmission inter-générationnelle de l'information épigénétique. Les cellules germinales femelles entrent en prophase de la méiose chez l'embryon et ne complèteront les divisions méiotiques que sur induction hormonale dans l'ovaire adulte et par la fécondation par un spermatozoïde. Pendant la phase de croissance, les ovocytes établissent les profils de méthylation de l'ADN au niveau des gènes et des régions de contrôle de l'empreinte parentale et subissent un remodelage de la chromatine et acquièrent la compétence pour l'embryogénèse.
Après la fécondation, les génomes parentaux haploïdes forment deux pronoyaux qui sont épigénétiquement distincts, ce qui reflète l'histoire des événements spécifiques de remodelage de la chromatine de la lignée germinale parentale. Les génomes paternel et maternel subissent un effacement actif et passif de méthylation de l'ADN. L'asymétrie dans les états de la chromatine des chromosomes paternels et maternels peut potentiellement réguler l'activation et la répression de l'expression *de novo* des gènes dans les embryons au stade pré-implantatoire et ainsi diriger l'embryogenèse. Un état latent, « en pause » (*poised*) épigénétique, caractérisé par la présence de marques « bivalentes » H3K4me3 et H3K27me3, au niveau du promoteur de gènes de développement, dépourvus d'expression à ces stades, est une propriété fondamentale du noyau de la lignée germinale des mammifères, conférant aux gamètes différenciés la capacité d'être prêt à « libérer », sans attendre, un programme de totipotence juste après la fécondation (d'après [39]).

l'absence d'altération épigénétique présumée causale suggère une transposition du marquage initial à d'autres marques ou complexes épigénétiques qui ont pris le relais. Il est ainsi possible que les modifications épigénétiques, présentes dans les cellules du sperme à la suite de l'exposition au stress maternel, soient transférées à d'autres marques, épigénétiques ou non, pour la maintenance et une transmission ultérieure [30, 53] *(Figure 5)*.

Plus récemment, l'implication des ncARN dans des effets/réponses transgénérationnels a été démontrée dans une espèce d'invertébré, *Caenorhabditis elegans*, dépourvue de méthylation de l'ADN [27]. L'exposition à des particules virales se traduit par l'apparition de ncARN dérivés du virus, qui inhibent, par interférence à l'ARN, l'expression du génome viral sur plusieurs générations, conférant ainsi une « immunité » transmissible [54, 55]. Une privation de nourriture pendant le stade larvaire se traduit également par l'apparition de microARN (miARN) ciblant des transcrits impliqués dans la nutrition et entraînant une augmentation de la longévité à la troisième génération. Pour se prémunir contre toute éventualité, ces miARN ciblent également des gènes normalement éteints mais susceptible de s'activer en réponse au stress [54].

Perspectives

Les influences des facteurs environnementaux sur les processus épigénétiques représentent une révolution dans le vaste monde de la transmission de l'information transgénérationnelle, mais des questions fondamentales demeurent : quelle est la véritable nature des impacts des facteurs environnementaux ? Quelle est la nature des cibles de ces facteurs (marques et/ou conformation) ? Vers quelles cibles l'information est-elle transférée ? Les mécanismes impliqués agissent-ils directement sur la cible ou bien par l'intermédiaire d'autres mécanismes connus et/ou encore inconnus ? Si les informations stockées persistent au fil des générations, quels en sont les mécanismes ? Quelles sont les fenêtres de sensibilité, d'insensibilité à ces facteurs ? Comment les différences liées au sexe des parents imposent-elles un dimorphisme sexuel sur la progéniture voire les générations suivantes [3, 12, 26, 29, 56] ?

L'implication de l'épigénétique dans les effets/réponses inter/transgénérationnels manque encore d'un modèle fédérateur [29]. Idéalement, avant de conclure à la nature épigénétique d'un effet transgénérationnel, et en raison de relations bidirectionnelles entre génétique et épigénétique, il faudrait vérifier par séquençage l'absence de nouvelles mutations dans la séquence de l'ADN. Une fécondation *in vitro*, un transfert d'embryon, et une adoption croisée à la naissance permettraient d'écarter d'autres hypothèses, comme le degré d'investissement maternel induit par le père. Ces expériences sont réalisables dans un modèle animal mais beaucoup plus difficiles chez l'humain. Les gènes, les séquences réfractaires à l'effacement qui échappent à la reprogrammation, et les mécanismes en jeu commencent à être identifiés et sont de bons candidats pour identifier les vecteurs qui transmettent l'information d'une génération à l'autre. Des études s'intéressant aux effets de l'environnement permettraient de savoir si ce sont ces séquences particulières qui portent la mémoire de ces effets, ou bien si d'autres séquences peuvent acquérir la même capacité à être réfractaire à l'effacement. En revanche, on ignore par quels processus, épigénétiques ou non, l'information se propage, ainsi que les mécanismes à l'origine des différences de transmission que l'on observe entre le père et la mère. Mais surtout, très peu d'études s'intéressent aux effets de l'environnement sur ces processus et à la compréhension de la transmission de la mémoire de ces événements ainsi qu'à l'identification des supports intermédiaires successifs. ◊

SUMMARY

Epigenetics in transgenerational responses to environmental impacts : from facts and gaps

The existence of non-genetic and non-cultural mechanisms that transfer information on the memory of parental exposures to various environments determining the reactivity of the following generations to their environments during their life are of growing interest. Yet fundamental questions remain about the nature, the roles and relative importance of epigenetic marks and processes, non-coding RNAs, or other mechanisms, and their persistence over generations. A model incorporating the various transmission systems, their cross-talks and windows of susceptibility to the environment as a function of sex/gender of parent and offspring, has yet to be built. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Almond D, Currie J. Killing me softly: the fetal origins hypothesis. *J Econ Perspect* 2011 ; 25 : 153-72.
2. Yan W. Potential roles of noncoding RNAs in environmental epigenetic transgenerational inheritance. *Mol Cell Endocrinol* 2014 ; 398 : 24-30.
3. Grossniklaus U, Kelly WG, Ferguson-Smith AC, *et al.* Transgenerational epigenetic inheritance: how important is it? *Nat Rev Genet* 2013 ; 14 : 228-35.
4. Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, *et al.* Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci* 2014 ; 17 : 667-9.
5. Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur J Hum Genet* 2002 ; 10 : 682-8.
6. Attig L, Vige A, Gabory A, *et al.* Dietary alleviation of maternal obesity and diabetes: increased resistance to diet-induced obesity transcriptional and epigenetic signatures. *PLoS One* 2013 ; 8 : e66816.
7. Arai JA, Feig LA. Long-lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment on memory formation. *Brain Res Bull* 2011 ; 85 : 30-5.
8. Junien C. L'empreinte parentale : de la guerre des sexes à la solidarité entre générations. *Med Sci (Paris)* 2000 ; 3 : 336-44.
9. Bromfield JJ, Schjenken JE, Chin PY, *et al.* Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 2200-5.
10. Curley JP, Mashoodh R, Champagne FA. Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm Behav* 2011 ; 59 : 306-14.
11. Junien C, Gabory A, Attig L. Le dimorphisme sexuel au XXIe siècle. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 185-92.
12. Pembrey M, Saffery R, Bygren LO. Human transgenerational responses to early-life experience: potential impact on development, health and biomedical research. *J Med Genet* 2014 ; 51 : 563-72.
13. Lane M, Robker RL, Robertson SA. Parenting from before conception. *Science* 2014 ; 345 : 756-60.
14. Dunn GA, Morgan CP, Bale TL. Sex-specificity in transgenerational epigenetic programming. *Horm Behav* 2010 ; 59 : 290-5.
15. Sugathan A, Waxman DJ. Genome-wide analysis of chromatin states reveals distinct mechanisms of sex-dependent gene regulation in male and female mouse liver. *Mol Cell Biol* 2013 ; 33 : 3594-610.
16. Drake AJ, Walker BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J Endocrinol* 2004 ; 180 : 1-16.
17. Anderson LM, Riffle L, Wilson R, *et al.* Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition* 2006 ; 22 : 327-31.
18. Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology* 2011 ; 152 : 2228-36.
19. Anway MD, Skinner MK. Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reprod Biomed Online* 2008 ; 16 : 23-5.
20. Martinez D, Pentinat T, Ribo S, *et al.* *In utero* undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered LXRA DNA methylation. *Cell Metab* 2014 ; 19 : 941-51.
21. Alter MD, Gilani AI, Champagne FA, *et al.* Paternal transmission of complex phenotypes in inbred mice. *Biol Psychiatry* 2009 ; 66 : 1061-6.
22. Alminana C, Caballero I, Heath PR, *et al.* The battle of the sexes starts in the oviduct: modulation of oviductal transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa. *BMC Genomics* 2014 ; 15 : 293.
23. Hackett JA, Surani MA. Beyond DNA: programming and inheritance of parental methylomes. *Cell* 2013 ; 153 : 737-9.
24. Duffie R, Bourc'his D. Parental epigenetic asymmetry in mammals. *Curr Top Dev Biol* 2013 ; 104 : 293-328.
25. Rando OJ. Daddy issues: paternal effects on phenotype. *Cell* 2012 ; 151 : 702-8.

RÉFÉRENCES

26. Daxinger L, Whitelaw E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat Rev Genet* 2012 ; 13 : 153-62.
27. Lim JP, Brunet A. Bridging the transgenerational gap with epigenetic memory. *Trends Genet* 2013 ; 29 : 176-86.
28. Aiken CE, Ozanne SE. Transgenerational developmental programming. *Hum Reprod Update* 2014 ; 20 : 63-75.
29. Heard E, Martienssen RA. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 2014 ; 157 : 95-109.
30. Drake AJ, Seckl JR. Transmission of programming effects across generations. *Pediatr Endocrinol Rev* 2011 ; 9 : 566-78.
31. Gowaty PA, Anderson WW, Bluhm CK, *et al.* The hypothesis of reproductive compensation and its assumptions about mate preferences and offspring viability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 15023-7.
32. Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, *et al.* RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006 ; 441 : 469-74.
33. Weiss IC, Franklin TB, Vizi S, Mansuy IM. Inheritable effect of unpredictable maternal separation on behavioral responses in mice. *Front Behav Neurosci* 2011 ; 5 : 3.
34. Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, *et al.* RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Dev Cell* 2008 ; 14 : 962-9.
35. Cowley M, Oakey RJ. Resetting for the next generation. *Mol Cell* 2012 ; 48 : 819-21.
36. Holland ML, Rakyan VK. Transgenerational inheritance of non-genetically determined phenotypes. *Biochem Soc Trans* 2013 ; 41 : 769-76.
37. Montellier E, Rousseaux S, Kochbin S. Feux croisés sur le nucléosome : bases moléculaires de la compaction du génome mâle haploïde. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 485-9.
38. Morrison KE, Rodgers AB, Morgan CP, Bale TL. Epigenetic mechanisms in pubertal brain maturation. *Neuroscience* 2014 ; 264 : 17-24.
39. Gill ME, Erkek S, Peters AH. Parental epigenetic control of embryogenesis: a balance between inheritance and reprogramming? *Curr Opin Cell Biol* 2012 ; 24 : 387-96.
40. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, *et al.* Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002 ; 117 : 15-23.
41. Riising EM, Comet I, Leblanc B, *et al.* Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. *Mol Cell* 2014 ; 55 : 347-60.
42. Festenstein R, Chan JP. Context is everything: activators can also repress. *Nat Struct Mol Biol* 2012 ; 19 : 973-5.
43. Brydges NM, Jin R, Seckl J, *et al.* Juvenile stress enhances anxiety and alters corticosteroid receptor expression in adulthood. *Brain Behav* 2014 ; 4 : 4-13.
44. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, *et al.* Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009 ; 460 : 473-8.
45. Saitou M, Kurimoto K. Paternal nucleosomes: are they retained in developmental promoters or gene deserts? *Dev Cell* 2014 ; 30 : 6-8.
46. Smith ZD, Chan MM, Humm KC, *et al.* DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* 2014 ; 511 : 611-5.
47. Radford EJ, Ito M, Shi H, *et al.* In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science* 2014 ; 345 : 1255903.
48. King V, Dakin RS, Liu L, *et al.* Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation. *Endocrinology* 2013 ; 154 : 2514-24.
49. Vassoler FM, White SL, Schmidt HD, *et al.* Epigenetic inheritance of a cocaine-resistance phenotype. *Nat Neurosci* 2013 ; 16 : 42-7.
50. Saab BJ, Mansuy IM. Neuroepigenetics of memory formation and impairment: the role of microRNAs. *Neuropharmacology* 2014 ; 80C : 61-9.
51. Liu WM, Pang RT, Chiu PC, *et al.* Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 490-4.
52. Abramowitz LK, Bartolomei MS. Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Curr Opin Genet Dev* 2012 ; 22 : 72-8.
53. Sharma A. Bioinformatic analysis revealing association of exosomal mRNAs and proteins in epigenetic inheritance. *J Theor Biol* 2014 ; 357 : 143-9.
54. Rechavi O, Minevich G, Hobert O. Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in *C. elegans*. *Cell* 2011 ; 147 : 1248-56.
55. Bélicard T, Félix MA. Transmission multigénérationnelle de l'interférence à l'ARN chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 574-7.
56. Rechavi O. Guest list or black list: heritable small RNAs as immunogenic memories. *Trends Cell Biol* 2014 ; 24 : 212-20.
57. Gabory A, Roseboom TJ, Moore T, et al. Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biol Sex Differ* 2013 ; 4 : 5.
58. Moisan MP, Le Moal M. Le stress dans tous ses états. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 612-7.
59. Junien C, Panchenko, Pirola L, *et al.* Le nouveau paradigme de l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD). Épigénétique, environnement : preuves et chaînons manquants. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : ???.

TIRÉS À PART

C. Junien et S. Fneich

ANNEXES

Tableau I. Effet de l'intervention nutritionnelle sur le phénotype de la descendance
Tableau II. Implication de la machinerie de l'acétylation des histones dans les processus métaboliques
Tableau III. Les gènes cibles fréquemment étudiés dans le contexte de la DOHaD
Tableau IV. Effets de l'obésité et la surnutrition maternelle sur le transport placentaire
Tableau V. Connaissances actuelles sur le conditionnement du phénotype hépatique par l'alimentation maternelle

Participations aux congrès

Tableau I. Effet de l'intervention nutritionnelle sur le phénotype de la descendance

Abréviations : PD - jour en post-natal ; Pparα - peroxisome proliferator-activated receptor-α ; OB - obésité / obèses ; Pgc1α - peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha ; PP - perte de poids ; Gcn5 (Kat2a) - general control of amino acid synthesis protein 5-like 2 / lysine acetyltransferase 2A ; CTRL - contrôle ; Sirt1 - sirtuin 1; PA - prise alimentaire ; Ampk - AMP-activated protein kinase ; TAB - tissu adipeux blanc ; Srebp1 - sterol regulatory element-binding protein1 ; TAB SC - tissu adipeux blanc sous-cutané ; TAB PG - tissu adipeux blanc péri-gonadique ; GS - glycogen synthase ; TAB PR - tissu adipeux blanc péri-rénal ; TG - triglycerides ; AG - acides gras ; G - jour gestationnel ; MCV - maladies cardio-vasculaires ; CHO - cholestérol ; BAR - chirurgie bariatrique ; HOMA - Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance ; RCIU - retard de croissance intra-utérin ; IPA - ingenuity pathway analysis ; LGA - enfant grand pour l'âge gestationnel (*large for gestational age*) ; F1 - descendants de la 1ère génération ; EXERC - exercice ; HFD - régime hyperlipidique (*high fat diet*) ; CD - régime contrôle (*control diet*)

Espèce	Caractéristiques maternelles			Phénotype métabolique des descendants		Gènes impliqués	Mécanismes épigénétiques	Ref.
	Protocole Obésité	Protocole Intervention	Phénotype	Phénotype	Organes / tissus affectés			
Homme	-	-	Femmes obèses (n=18053) avec 4,7% des femmes avec perdu de poids pendant la grossesse	Perte de poids ou faible gain de poids pendant la grossesse: ↓ risque de macrosomie	-	-	-	Bogaerts et al. 2015
Homme	-	-	Evolution de l'IMC = PP préconceptionelle (entre 20 ans et la grossesse)	Femmes sans surpoids (IMC < 25): PP avant la grossesse serait associée à un risque de petit poids des enfants à la naissance	-	-	-	Diouf et al. 2011
Homme	-	-	Femmes en surpoids ou obèses, perte > 1 unité d'IMC avant la 2ème grossesse	↓ risque d'avoir un enfant LGA	-	-	-	Villamor et al. 2006
Homme (revue)	-	BAR	complications métaboliques diminués (hypertension et diabète gestationnels, pré-éclampsie, césarienne)	↓ risque de la macrosomie ou de l'enfant LGA (6 études). Diminution du poids des enfants à la naissance (8 études). Pas d'effet sur le poids à la naissance (8 études). Risque de RCIU augmenté (5 études)	-	-	-	Kjaer et al. 2013
Homme	-	BAR: comparaison entre les enfants nés avant et après la chirurgie	Perte de 36% du poids corporel, amélioration du profil métabolique, diminution des complications de grossesse	BAR: poids à la naissance et macrosomie sont diminués. Prévalence de l'obésité sévère est diminué de 24% (à l'âge de 2,5 à 26 ans). niveau des TG, de l'insuline et du glucose & HOMA sont diminués	-	-	-	Smith et al. 2009
Homme	-	BAR: comparaison entre les enfants nés avant et après la chirurgie	BAR: Perte de poids (IMC = 45 -> 28), amélioration du profil métabolique (insulinémie, lipidémie, pression artérielle)	BAR: diminution de l'insulinémie et de la pression artérielle	Sang	expression différentielle (862 probes). Expression de 25-28% gènes impliqués dans les 3 fonctions (IPA) est corrélée avec leur niveau de la méthylation	5698 gènes differentiellement méthylés, impliqués dans les 3 fonctions (selon une analyse IPA): les maladies métaboliques, inflammation et MCV	Guenard et al. 2013
Homme (revue)	-	-	PP: amélioration de la fertilité, réduction de risque de pré-éclampsie ou de diabète gestationnel	2 études détectées: le risque de macrosomie diminué si entre deux grossesses la mère a perdu du poids	-	-	-	Forsum et al. 2013
Mouton	Régime Standard. 150% de la norme nutritionnelle, 2 mois avant la conception et pendant la gestation	Groupe INT: Consommation alimentaire des femelles OB diminuée à 100% de la norme, 2 mois avant la conception et jusqu'à G28	INT: Poids et adiposité à la conception non normalisés. Glycémie, insulinémie, tolérance au glucose améliorés	A G75: fœtus OB - macrosomie; INT - restauration du poids fœtal. niveau du glucose fœtal restauré, niveaux insuline, TG, CHO et cortisol améliorés. A G135: niveau de glucose fœtal non restauré (INT), niveaux insuline, TG, CHO et cortisol restaurés	Fœtus OB à G75 poids des organes ↑(cœur, reins, pancréas, foie, TAB PR); développement du cœur perturbé, poids hépatique et TAB PR ↑ à G135. Fœtus INT - restauration de ces paramètres. Transport placentaire est affecté par OB et PP maternelles	G135: OB - ↑ de GLUT3 et FATP1 dans le placenta. INT - GLUT3 n'est pas normalisé, FATP1 est normalisé	-	Tuersunjiang et al. 2013
Mouton	Régime Standard. *ad libitum* (170–190% de la norme nutritionnelle) pendant 5 mois avant la conception gestation, puis le transfert d'embryon dans une brebis porteuse	INT: *ad libitum* pendant 4 mois, puis à 70% de la norme pendant 1 mois avant la conception; transfert d'embryon dans une brebis porteuse à 1 sem de gestation	INT: PP légère, sans une restauration du poids ou du niveau de l'insuline au moment de la conception	Descendance à 4 mois : augmentation de l'adiposité chez les femelles des mères OB; restauration presque complète chez INT. Pas d'effet du régime maternel chez les mâles.	TAB	-	-	Rattanatray et al. 2010
				Pas d'effet du régime maternel sur le poids des descendants à la naissance ou à l'âge de 4 mois	Foie	OB maternelle: IR, AKT2, pAKT, pFOXO1, *Pepck* et *11βHsd1* sont down-régulés dans le foie. INT: restauration de niveau de IR, pAKT, pFOXO1, *Pepck, 11βHsd1* au niveau contrôle	OB maternelle: ↑ expression de miR29b, miR103 et miR107 dans le foie. INT: restauration de niveau de miR107 au niveau contrôle	Nicholas et al. 2013
				Pas d'effet du régime maternel sur le poids des descendants à la naissance ou à l'âge de 4 mois	Muscle squelettique	OB maternelle: pas d'effet ni sur la voie de l'insuline, ni sur GS; up-régulation de GLUT4 (chez les femelles) dans le muscle. INT: pas de restauration de niveau de GLUT4 au niveau contrôle	-	Nicholas et al. 2013
				Pas d'effet du régime maternel sur le poids des descendants à la naissance ou à l'âge de 4 mois	Foie	OB maternelle: PPARα, PGC1α et GCN5 (KAT2a) sont down-régulés, tandis que SIRT1, AMPK et SREBP1 sont up-régulés dans le foie. INT: pas de restauration du niveau de ces protéines	-	Nicholas et al. 2014
Souris	HFD (60%). 6 sem avant la conception, pendant la gestation et la lactation	INT: remplacement du régime HFD par CD pour la période de lactation	Obésité sous le HFD; INT: poids non précisé	OB maternelle: ↑ poids corporel (au sevrage et au PD35), activation microgiliale cérébrale, hyperactivité (mâles), hyperanxiété (femelles), ↓ sociabilité (femelles). INT: restauration du poids au sevrage, mais pas à PD35, réactivité microgliale améliorée, restauration de sociabilité, mais pas de restauration d'autres paramètres comportementales.	Cerveau	OB maternelle: ↑ niveau protéique de IL1β et TNFα (F1 femelles). INT: restauration du niveau		Kang et al. 2014
Souris	Mode de vie standard des souris considéré comme obésogène	Environnement enrichi (EXERC physique) durant 4 sem avant la conception	PP de 17%; amélioration des paramètres métaboliques (adiposité, tolérance au glucose) par rapport aux femelles élevées en cages standards	F1 à 16 sem: diminution du poids corporel, amélioration des paramètres métaboliques. Les mêmes effets observés après le transfert embryonnaire et chez les F2.	Foie des F1: niveau des TG et CHO diminué (F1, F2). Ovocytes maternels: méthylation de l'ADN et transcriptome altérés	Altération du transcriptome hépatique. Gènes du métabolisme lipidique sont down-régulés. Altération du transcriptome des ovocytes	Foie des F1: méthylation de l'ADN altérée; corrélation entre la méthylation et l'expression des gènes du métabolisme lipidique. Ovocytes maternels: altération du niveau de la méthylation, transmise à la descendance (foie à PD21)	Wei et al. 2015
Rat	Formule du lait hyperglycidique: 56% glucides, 24% protéines, 20% des lipides, Nutrition intragastrique (PD4-24)	"*Pair-feeding*": le même quantité d'aliment que mangent les rats CTRL quotidiennement. Période: à partir du sevrage, pendant la gestation et la lactation	Restauration du poids grâce au pair-feeding	A E19: pas d'effet de l'obésité ou de la PP maternelles sur le poids fœtal. Descendants mâles adultes: poids normalisé par la PP maternelle. normalisation du niveau de l'insuline dans le sang fœtal. Descendants mâles adultes: normalisation des l'insulinémie, des TG et des AG libres par la PP maternelle	A E19: Normalisation de la fonction sécrétoire des îlots pancréatiques (*in vitro*)	-	-	Srinivasan et al. 2005
Rat	HFD à partir du sevrage (100 jours), pendant la gestation et lactation	69 jours sous HFD, 1 mois avant la conception - sous CD	Au moment de la conception: le poids des femelles PP est intermédiaire entre les CTRL (9% de plus) et OB (16% de plus)	Pas d'effet ni sur le poids à la naissance, au sevrage, au jour PD120 ou PD150 (mâles), ni sur la PA. Au sevrage: les TG, la leptine, l'insuline sont restaurés chez les mâles des mères PP. PD120: hyperinsulinémie et une hyperglycémie légère chez les mâles PP. PD150: restauration du niveau de la leptine.	Mâles PP: restauration au sevrage du poids de TAB SC. Restauration partielle au PD150 du poids du TAB PG et de la taille des adipocytes	-	-	Zambrano et al. 2010
Rat	HFD A partir du sevrage, pendant la gestation et lactation	EXERC physique volontaire - course dans une roue tournante (30 min/jour pendant 1 mois avant la conception; 15 min/jour pendant la gestation)	Pas d'effet sur le poids corporel; restauration de la fertilité; amélioration du métabolisme glucidique et lipidique	Pas d'effet sur le poids à la naissance, ni au PD36. OB maternelle: les niveaux de la leptine et des TG sont élevés chez les mâles, mais pas chez les femelles. EXERC: restauration totale du niveau de la leptine, restauration partielle des TG chez les mâles.	Mâles: le poids de TAB PR est élevé	-	-	Vega et al. 2015

Tableau II. Implication de la machinerie de l'acétylation des histones dans les processus métaboliques

Abréviations : H - histone; K - lysine ; ac - acétylation; me - méthylation; HFD - régime hyperlipidique (*high fat diet*); LPD - régime pauvre en protéines (*low-protein diet*); RCIU - retard de croissance intra-utérin; FGR - restriction de croissance fœtale (*fetal growth restriction*); DT2 - diabète de type 2; NAFLD - stéatose hépatique (*non alcoholic fatty liver disease*); F1 - descendants de la 1ère génération; KO - knockout; SNP - single-nucleotide polymorphism (polymorphisme d'un seul nucléotide); TG - triglycéride; TAB - tissu adipeux blanc; TA brun - tissu adipeux brun; DOHaD - *developmental origins of health and disease* (origines développementales de la santé et des maladies); NAFLD - stéatose hépatique (*non-alcoholic fatty liver disease*); DIO - *diet-induced obesity*

Famille	Gène	Nom complet	Ref.	Modèle	Phénotype	Gènes cibles
Histone lysines acétyltransférases	***Kat2a (Gcn5)***	General Control Non-repressed Protein 5	Jin et al. 2014	*in vitro:* Double KO Gcn5$^{flox/flox}$; PCAF$^{-/-}$ adipocytes brun. *In vivo:* KO de Gcn5 létal	*in vitro:* Différenciation des fibroblastes en adipocytes brun abolie, pas d'accumulation des lipides; *in vivo:* quantité de tissu adipeux brundiminuée à E16.5	*Pparγ, Cebpα*
			Lerin et al. 2006	Souris injectées avec un adenovirus contenant Kat2a	Hypoglycémie à jeun, conversion du pyruvate en glucose diminuée	*Pepck,G6P*
	Kat3a (CBP/ CREBbp)	CREB-binding protein (CREBBP)	Zhou et al. 2004	Souris Crebbp$^{+/mut}$ and Crebbp$^{mut/mut}$	Hyperglycémie, intolérance au glucose, insulinorésistance, hyperinsulinemie, ↓ sécrétion de l'insuline; activation de la néoglucogenèse dans un état nourri	*G6pc, Pepck, Pgc1a*
	Kat3b (p300)	E1A binding protein p300	Chatterjee et al. 2011	Adipocytes sous-cutanés humains	Remplace *Hdac9* au niveau du promoteur de *Cebpα* au cours de la différenciation des adipocytes	*Cebpα*
			Li et al. 2013	Humain placenta	↑ H3K9ac, H3K27ac 11βHsd-2	
			Bricambert et al. 2010	Souris injectés avec l'adenovirus surexprimant *Kat3b*. Hépatocytes murins *in vitro:* surexpression ou inhibition	*In vivo:* ↑ la stéatose hépatique, TG plasmatiques. L'insulinorésistance, l'intolérance au glucose. ↑ H3K9ac. ↑ expression des gènes de la lipogenèse et de la néoglucogenèse	*L-PK, Pepck, G6pase*
	Kat6b (MORF/ MYST4)	MYST histone acetyltransferase monocytic leukemia 4	Gupta et al. 2012	*in vitro* (cellules 3T3): concentration de glucose et d'insuline élevée	↓ expression de *Kat6b, Kdm4b* (*Jmjd2b*); ↓ H3ac, H3K4me1, ↑ H3K9me1 au niveau du gène *Kat6b*	
	Kat13a (SRC1 / NCoa1)	Steroid Receptor Coactivator-1	Wang et al. 2006	Souris double KO *Kat13a* et *Kat13b*	Phénotype de résistance au HFD: hyperphagie,↑ métabolisme basal, ↑ activité physique. Blockage du développement du tissu adipeux brun.	*Pparγ*
	Kat13b (SRC3 / Ncoa3 / p/CIP)	Nuclear receptor coactivator 3 / Steroid Receptor Coactivator-3	Ma et al. 2011	Souris SRC3$^{-/-}$	Stéatose hépatique et l'état inflammatoire améliorés sous HFD	*Pparα*
			Wang et al. 2006	Souris double KO *Kat13a* (Src1) et *Kat13b (SRC3 / p/CIP)*	Phénotype de résistance au HFD: hyperphagie, ↑ métabolisme basal, ↑ activité physique. Blockage du développement du tissu adipeux brun.	*Pparγ*
			Coste et al. 2008	Souris SRC3$^{-/-}$	**Souris KO:** Phénotype de résistance au HFD: ↑ fonction mitochondriale, ↑ dépense énergétique. **Souris HFD:** ↑ expression de *Src3* et *Gcn5 (Kat2a)*, ↓ expression de *Sirt1*. ↓ expression de *SRC3* et *Gcn5 (Kat2a)* à jeun.	*Kat2a*
	Kat13c (SRC2 / NCoa2)	Steroid Receptor Coactivator-2	Picard et al. 2002	Souris SRC2$^{-/-}$	Phénotype de résistance au HFD: hyperphagie, ↑ thermogenèse, ↓ glycémie à jeun, ↑ sensibilité à l'insuline, ↓ TG. TAB: ↓ PPARγ et accumulation des lipides; TA brun: ↑ thermogenèse (activité de PGC1α).	*Pparγ*
	Kat13d (Clock)	Circadian locomotor output cycles kaput	Sookoian et al. 2008	SNPs dans *Clock* chez l'homme	4 SNPs associés avec surpoids ou obésité	
			Turek et al. 2005	Souris avec *Clock* muté	Syndrome métbolique; obésité, hyperphagie, hyperléptinemie, hyperlipidémie, stéatose hépatique, hyperglycémie, DT2. Perturbation des rythmes circadiens	
			Oishi et al. 2005	Souris Clock$^{-/-}$ dans le foie	Expression circadienne de *Papra*. Souris Clock-/-: la cyclicité d'expression de *Pparα* est perdue	*Pparα*
			Garaulet et al. 2010	SNPs dans *Clock* chez l'homme	4 SNPs associés avec obésité et cholestérol plasmatique. Un SNP peut prédire le résultat du régime en terme de perte de poids	
Histone desacétylases	***Hdac1***		Aagaard-Tillery et al. 2008	Régime HFD chez la mère (macaques)	HFD maternel: ↑ TG hépatiques, ↑ H3K14ac; ↓ expression de *Hdac1* et de son activité enzymatique (foie fœtal)	*DNAJA2, Rdh12, Npas2, GPT2*
			Yoo et al. 2006	Cellules 3T3-L1 / cellules KO Hdac1 / surexpression de Hdac1	Au cours de la **différenciation:** ↑ H3K9ac, ↑ H4K8ac, ↓ H3K9me, ↓ expression de *Hdac1*, ↓ activité HDAC, recrutement de HDAC1 au promoteurs des gènes adipogéniques. **Surexpression:** ↓ différenciation. **KO**: ↑ différenciation	*Pparγ, Srebp1c*
			Raychaudhuri et al. 2008	Sous-utrition maternelle (rat) -> muscle des descendants (DOHAD)	↑ HDAC1, HDAC4, DNMT3a, DNMT3b, Suv39H1; ↓H3ac, ↓H3K14ac, ↑H3K9me2; pas de différence en méthylation de l'ADN (3 CpG du promoteur de *Glut4*).	*Glut4*
			Fu et al. 2004	Ligature des artères utérines chez le rat (insuffisance placentaire) -> foie des descendants (DOHAD)	↓ HDAC1, ↑ H3K9ac, H3K14ac et H3K18ac (niveau global); ↑ H3K9ac (*Pgc1α)*	*Pgc1α, CPT1*
	Hdac2		Yoo et al. 2006	Cellules 3T3-L1	↑ H3K9ac, ↑ H4K8ac, ↓ H3K9me, ↓ expression de *Hdac1*, *Hdac2*, *Hdac5*, et *Hdac6*, ↓ activité HDAC au cours de la différenciation.	
	Hdac3		Zheng et al. 2012	Régime HFD chez la mère (rat)	↓ *p16^{INK4a}* (glande mammaire de la descendance), ↓ recrutement de HDAC3 au niveau de son promoteur, ↓ H4ac	*p16^{INK4a}*
			Funato et al. 2011	Souris sous HFD / jeune de 16 heures	Jeune: ↑ expression de *Hdac3*, ↓ H3ac, H4ac (hypothalamus)	
			Feng et al. 2011	Souris KO *Hdac3*	Souris KO: stéatose hépatique. HDAC3 est recrutée par le Rev-erbα dans le foie. Le niveau de H3K9ac, marque cible de HDAC3, présente les rhythes circadiens	
	Hdac4		Funato et al. 2011	Souris sous HFD / jeune de 16 heures	Jeune: ↑ expression de *Hdac4*, ↓ H3ac, H4ac (hypothalamus)	
			Raychaudhuri et al. 2008	Sous-utrition maternelle (rat) -> muscle des descendants (DOHAD)	↑ HDAC1, HDAC4, DNMT3a, DNMT3b, Suv39H1; ↓H3ac, ↓H3K14ac, ↑H3K9me2; pas de différence en méthylation de l'ADN (3 CpG du promoteur de *Glut4*).	*Glut4*
	Hdac5		Funato et al. 2011	Souris sous HFD / jeune de 16 heures	↑ expression de *Hdac5* (HFD)	
			McGee et al. 2008	Cellules musculaires humaines	HDAC5 inhibe la transcription de Glut4	Glut4
			Yoo et al. 2006	Cellules 3T3-L1	↑ H3K9ac, ↑ H4K8ac, ↓ H3K9me, ↓ expression de *Hdac1*, *Hdac2*, *Hdac5*, et *Hdac6*, ↓ activité HDAC au cours de la différenciation.	
	Hdac6		Yoo et al. 2006	Cellules 3T3-L1	↑ H3K9ac, ↑ H4K8ac, ↓ H3K9me, ↓ expression de *Hdac1*, *Hdac2*, *Hdac5*, et *Hdac6*, ↓ activité HDAC au cours de la différenciation.	
	Hdac8		Funato et al. 2011	Souris sous HFD / jeune de 16 heures	↑ expression de *Hdac8* (HFD)	
	Hdac9		Chatterjee et al. 2011	Souris KO pour *Hdac9* / surexpression de *Hdac9* dans les cellules 3T3-L1	KO: différenciation accélérée, ↑ expression *Cebpα* ; Surexpression: pas de différenciation, ↓ expression *Cebpα*	*Pparγ, Cebpα*
	Hdac10		Funato et al. 2011	Souris sous HFD / jeune de 16 heures	Jeune: ↓ expression de *Hdac10*, ↓ H3ac, H4ac (hypothalamus)	
	Hdac11		Funato et al. 2011	Souris sous HFD / jeune de 16 heures	Jeune: ↓ expression de *Hdac11*, ↓ H3ac, H4ac (hypothalamus)	
	Sirt1	Sirtuin-1 (silent mating type information regulation 2 homolog)	Kim et al. 2010	Patients NAFLD	↓ SIRT1, SIRT6 dans le foie	
			Purushotham et al. 2009	Souris KO *Sirt1*dans le foie	↓ expression des gènes cibles de *Pparα* et des gènes de la β-oxydation des AG; NAFLD	*Pparα*
			Rodgers et al. 2007	Souris KO *Sirt1* / surexpression de *Sirt1*	**KO:** hypoglycémie, ↑ tolérance au glucose et à l'insuline, ↓ production du glucose; ↑ AG libres, cholestérol hépatique; altération de l'expression des gènes de la néoglucogenèse, de la glycolyse, de transport du cholestérol et du métabolisme des AG. **Surexpression:** ↓ tolérance au glucose	
			Suter et al. 2012	HFD maternel	Foie fœtal: ↑ H3K14ac, ↓ expression de SIRT1 et son activité de HAT, expression altérée des gènes cibles de SIRT1	PPARα, PPARγ, SREBF1, CYP7A1, FASN, SCD
			Geng et al. 2011	Restriction calorique chez le rat âgé	↑ SIRT1, SIRT5 dans le cerveau. Meilleures performances dans les testes de mémoire	
			Crujeiras et al. 2008	Obese patients + régime hypocalorique (8 semaines)	Patients obèses perdu du poids: ↑ SIRT1, SIRT2 dans les cellules mononuclées de sang périphérique	
	Sirt2		Jing et al. 2007	Cellules 3T3-L1: surexpression / KO	*in vitro*: ↓ au cours de différenciation adipocytaire. KO: ↑ adipogenèse, surexpression: ↓ adipogenèse	*Pparγ, Cebpα, FoxO1, Glut4, aP2, FAS*
			Crujeiras et al. 2008	Obese patients + régime hypocalorique (8 semaines)	Patients obèses perdu du poids: ↑ expression de *SIRT1, SIRT2* dans les cellules mononuclées	
	Sirt3		Hierchey et al. 2011	Souris KO SIRT3 / HFD chronique / SNP dans SIRT3 chez l'homme	Souris KO (sous HFD): DIO accéléré, insulino-résistance, stéatose hépatique, hyperlipidémie, inflammation. Hyperacétylation des protéines mitochondriales. HFD: ↓ expression de *Sirt3* (foie). Mutation de *SIRT3* chez l'homme: risque de développer le syndrome métabolique	
	Sirt4		Nasrin et al. 2010	Souris KO *Sirt4* / myotubes primaires KO *Sirt4* / souris diabétiques ob/ob, db/db et KKA^{y}	**KO SIRT4:** ↑ expression des gènes d'oxydation lipidique dans le foie; **Myotubes KO:** ↑ oxydation des acides gras, respiration cellulaire. **Souris diabétiques:** ↑ expression de *Sirt4*	*Sirt1*, *Sirt3*, *Pgc1α*, *Pparα*.
			Savastano et al. 2015	Patients obèses	↓ SIRT4 dans le sang	
			Haigis et al. 2006	Souris KO SIRT4 / restriction calorique	**KO:** ↑ insuline plasmatique après le repas et à jeun, ↓ glucose à jeun, ↑ sécrétion de l'insuline en réponse aux acides aminés et au glucose; **Restriction calorique:** ↓ SIRT4	
	Sirt5		Geng et al. 2011	Restriction calorique chez le rat âgé	↑ SIRT1, SIRT5 dans le cerveau. Meilleures performances dans les testes de mémoire	
	Sirt6		Kim et al. 2010	Souris KO conditionnel *Sirt6* (foie) / culture des hépatocytes primaire / Patients NAFLD	**Souris KO:** stéatose hépatique, ↑ glycolyse, synthèse des TG, ↓ β-oxydation, ↑ poids du foie; ↑ expression des gènes de la glycolyse et du métabolisme lipidique; ↑ H3K9ac au niveau de plusieurs promoteurs. **Patients NAFLD** - ↓ SIRT1, SIRT6	*Gk, Lpk, Acc1, Fas*
			Kanfi et al. 2008	Restriction calorique chez le rat / jeune chez la souris / cellules L6 (myoblastes) ou HEK293 (cellules embryonnaires rénales humanes)	3 modèles: ↑ SIRT6 (cœur, reins, cerveau, TAB)	
			Schwer et al. 2010	Souris KO conditionnel *Sirt6* (neurones)	Retard de croissance post-natale, obésité. Hyperacétylation de H3K9 et H3K56 (hypothalamus, hippocampe, cortex, cervelet)	
	Sirt7		Yoshizawa et al. 2014	Souris KO *Sirt7*	Résistance à DIO sous HFD, à la stéatose hépatique et à l'intolérance au glucose; ↓ expression des gènes impliqués dans la lipogenèse. Régulation positive de TR4/TAK1 (récepteur nucléaire impliqué dans le métabolisme lipidique)	TR4
Protéines à bromo-domaine	***Brd2 (Ring3)***	Bromodomain-containing protein 2	Wang et al. 2011	Souris KO (↓Brd2): obésité sévère sans le DT2; souris *Brd2$^{-/-}$* - létal	Obésité: ↑ poids corporel, prise alimentaire, nombre de cellules β pancréatiques, insuline, IL-1β, TNF-α, stéatose hépatique; mais ↓ infiltration de TAB par des macrophages, ↑ tissu adipeux brun et production de chaleur, ↑ tolérance au glucose, adiponectine, ↓ glucose à jeun	*Pparγ*
	Brd8	Bromodomain-containing protein 8	Couture et al. 2012	KO (cellules 3T3-L1)	Différenciation adipocytaire abolie, pas d'accumulation des lipides	*Pparγ*

Tableau III. Les gènes cibles fréquemment étudiés dans le contexte de la DOHaD.

Abréviations : H - histone; K - lysine; ac - acétylation; me - méthylation; HFD - régime hyperlipidique (*high fat diet*); LPD - régime pauvre en protéines (*low-protein diet*); RCIU - retard de croissance intra-utérin; FGR - restriction de croissance fœtale (*fetal growth restriction*); DT2 - diabète de type 2; NAFLD - stéatose hépatique (*non alcoholic fatty liver disease*); F1 - descendants de la 1ère génération; PD - jour en post-natal; Mecp2 - methyl CpG binding protein 2; HDAC - histone deacetylase; Dnmt - DNA methyltransferase; ADN - acide désoxyribonucléique; ARNm - acide ribonucléique messager; Sirt - sirtuine; Suv39H1 - suppressor of variegation 3-9 Homolog 1; Kmt - Lysine (K)-specific methyltransferase; Ezh2 - enhancer of zeste 2 Polycomb repressive complex 2 subunit.

Gène	Espèce	DOHaD	Tissu	Régulation épigénétique	Effet sur expression du gène	Modificateurs épigénétiques	Référence
GR / Nr3c1 (Glucocorticoid Receptor)	Rat	Comportement maternel -> réponse au stress (F1)	Hippocampe	Hyperméthylation; ↓ H3K9ac		*HDACs*	Liu et al 1997; Weaver et al. 2004
	Rat	Régime LPD maternel -> modifications épigénétiques de GR (F1)	Foie	↑H3K9ac, H4K9ac, H3K4me; ↓H3K9me2/3; hypométhylation de *GR*	↑	*Dnmt1, Mecp2*	Lillycrop et al. 2007
	Rat	Régime HFD maternel -> diminution du comportement anxieux (F1)	Hippocampe	-		-	Sasaki et al. 2014
	Humain	Depression maternelle -> réponse au stress (F1)	Cordon ombilical	Association entre la méthylation de *Gr* et la depression maternelle et la réponse au stress des enfants		-	Oberlander et al. 2008
	Rat	Carrences nutritionnelles (calcium) maternelles -> niveau de corticostérone élevé (F1, mâles)	Foie	Hypométhylation (2 CpG)		-	Takaya et al. 2013
	Humain	Depression maternelle pendant la grossesse -> comportement neurologique du nouveau-né	Placenta	Hypeméthylation (1 CpG); association entre le niveau de méthylation, la depression maternelle et le comportement du nouveau-né		-	Conradt et al. 2013
	Rat	Régime LPD maternel -> modifications épigénétiques de *GR* (F1, F2)	Foie	Hypométhylation		-	Burdge et al. 2007
	Mouton	Sous-nutrition maternelle -> modifications épigénétiques de GR (F1)	Hypothalamus	Hypométhylation; ↓H3K27me3, ↑H3K9ac	↑	-	Begum et al. 2013
11βHsd-1 (11β-hydroxysteroid dehydrogenase-1)	Rat	Carrences nutritionnelles (calcium) maternelles -> niveau de corticostérone élevé (F1, mâles)	Foie	Hypométhylation (2 CpG)		-	Takaya et al. 2013
11βHsd-2 (11β-hydroxysteroid dehydrogenase-2)	Humain	Anxiété maternelle pendant la grossesse -> comportement neurologique du nouveau-né	Placenta	Hyperméthylation (1 CpG); association entre le niveau de méthylation, l'anxiété maternelle et le comportement du nouveau-né		-	Conradt et al. 2013
	Rat	Stress maternel pendant la gestation -> modifications épigénétiques de *11βHsd-2*	Placenta & cerveau foetal	Placenta: hyperméthylation. Hypothalamus foetal: hypométhylation du promoteur & hyperméthylation de l'exon 1		Placenta: ↑ DNMT3a	Jensen Pena et al. 2012
Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1)	Rat	RCIU -> DT2, modifications épigénétiques (F1)	Pancréas	Animaux présentant un RCIU: hyperméthylation; désacétylation de l'H3 et H4, ↓ H3K4me3, ↑H3K9me2	↓	DNMT1, DNMT3a, HDAC1	Park et al. 2008
Irs1 (Insulin receptor substrate 1)	Rat	Surnutrition néonatale -> obésité et DT2 / modifications épigénétiques (F1)	Muscle	Hyperméthylation	Corrélation avec la diminution de l'expression	-	Liu et al. 2013
Glut3 (Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3)	Souris	Sous-nutrition maternelle -> FGR, ↓ transport de glucose, modifications épigénétiques dans le placenta	Placenta	↑ méthylation d'un îlot CpG de promoteur de *Glut3*	↓ expression de *Glut3*	↑ fixation de MeCP2, DNMT3B, recrutement de HDAC2	Ganguly et al. 2014
Glut4 Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4)	Rat	RCIU (sous-utrition) -> ↓ expression de *Glut4,* modifications épigénétiques (F1, femelles)	Muscle	↓ H3ac, H3K14, ↑H3K9me2; pas de différence en méthylation de l'ADN (3 CpG du promoteur).		↑ HDAC1, HDAC4, DNMT3a, DNMT3b, Suv39H1 (F1 adultes); ↑ DNMT1 (F1 PD2)	Raychaudhuri et al. 2008
	Rat	Surnutrition néonatale -> obésité et DT2 / modifications épigénétiques de la voie de l'insuline (F1)	Muscle	Hyperméthylation	Corrélation avec la diminution de l'expression	-	Liu et al. 2013
Igf2 (Insulin-like growth factor 2)	Humain	Sous-nutrition maternelle -> modifications épigénétiques d'*Igf2* (F1)	Sang	Hypométhylation		-	Heijmans et al. 2008
Leptin	Humain	Sous-nutrition maternelle -> modifications épigénétiques de *Lep* (F1)	Sang	Hyperméthylation	pas de données d'expression	-	Tobi et al. 2009
	Souris	Régime LPD maternel -> ↓ poids corporel, ↑ prise alimentaire; modifications épigénétiques (F1)	Tissu adipeux blanc	Hypométhylation	↓	-	Jousse et al. 2011
Pomc (Pro-opiomelanocortin)	Rat	Surnutrition néonatale -> obésité, résistance à la leptine (F1)	Hypothalamus	Hyperméthylation		-	Plagemann et al. 2009
	Humain	-	Leukocytes	Hyperméthylation (personnes repris le poids)		-	Crujeiras et al. 2013
	Rat	-	Hypothalamus	Hyperméthylation (obésité provoquée par HFD); méthylation de cetains CpG corrélée avec poids corporel / concentration de la leptine		-	Marco et al. 2013
	Souris	Régime hyperlipidique-glucidique maternel -> obésité et DT2 (F1)	Hypothalamus	Hypométhylation		-	Zheng et al. 2015
Npy (Neuropeptide Y)	Humain	-	Leukocytes	Hypométhylation (personnes repris le poids)		-	Crujeiras et al. 2013
Pparα (Peroxisome proliferative activated receptor α)	Rat	Obésité maternelle -> obésité & perturbations des rythmes circadiens (F1)	Foie	↑ H3K27me3, ↑ H3K4me3		↑ *Kmt6 (Ezh2),* ↓ *Sirt1*	Borengasser et al. 2014
	Rat	Régime LPD maternel -> modifications épigénétiques de *Pparα* (F1, F2)	Foie	Hypométhylation		-	Burdge et al. 2007
	Rat	Régime LPD maternel -> modifications épigénétiques de *Pparα* (F1)	Foie	Hypométhylation	Relation négative entre le niveau de méthylation de 2 CpG et l'expression d'ARNm	-	Lillycrop et al. 2008
Pparγ (Peroxisome proliferative activated receptor γ)	Rat	Obésité maternelle -> transcriptome et méthylome altérés; différenciation adipocytaire accrue (F1)	Tissu adipeux blanc	Hypométhylation des îlots CpG		-	Borengasser et al. 2013
Pgc-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α)	Souris	Régime HFD maternel -> modifications épigénétiques, NAFLD (F1)	Foie	Hyperméthylation		-	Pruis et al. 2014
	Rat	RCIU -> modifications épigénétiques (F1)	Foie	↑ H3K9ac, H3K14ac et H3K18ac (niveau global); ↑ H3K9ac (*Pgc1α*)		↓ HDAC1	Fu et al. 2004
Cebpβ (CCAAT/enhancer binding protein β)	Rat	Régime LPD maternel -> modifications épigénétiques de *Cebp*β (F1)	Muscle	↑ H3ac, ↑ H4ac; ≠ H3K4me2, ≠ H3K9me3		-	Zheng et al. 2011
	Rat	Obésité maternelle -> transcriptome et méthylome altérés; différenciation adipocytaire accrue (F1)	Tissu adipeux blanc	Hypométhylation des îlots CpG		-	Borengasser et al. 2013
Pepck (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase)	Rat	Régime HFD maternel -> hyperglycémie & poids élevé à la naissance (F1)	Foie	↑ H4ac, ↑ H3K4me2 (région codante & en amont du promoteur); ↓ H3K9me3, ↓ H3K27me3 (promoteur)		-	Strakovsky et al. 2011

Tableau IV. Effets de l'obésité et la surnutrition maternelle sur le transport placentaire

Nutriment	Transporteur	Espèce	Environnement maternel	Altérations de l'expression / effet sur le poids fœtal	Références
Glucose	Glut1	Souris	HFD+HS	↑ GLUT1 ; ↑ poids fœtal	(Rosario et al., 2015)
		Souris	HFD	↑ GLUT1 ; ↑ poids fœtal	(Jones et al., 2009)
		Homme	Obésité	Corrélation: GLUT1 & poids à la naissance; ↑ poids fœtal	(Acosta et al., 2015)
	Glut3	Souris	HFD+HS	↑ GLUT3 ; ↑ poids fœtal	(Rosario et al., 2015)
		Souris	HFD+HS	↑ *Glut3* ; ↓ poids fœtal	(Sferruzzi-Perri et al., 2013)
	Glut4	Homme	Obésité + GDM	↓ *GLUT4*; ↓ poids fœtal	(Colomiere et al., 2009)
Acides aminés	Système A	Souris	HFD	↑ *Slc38a2* (*Snat2*) (M); ↓ poids	(King et al., 2013)
		Souris	HFD+HS	↑ *Slc38a2* (*Snat2*) ; ↓ poids fœtal	(Sferruzzi-Perri et al., 2013)
		Souris	HFD	↑ SLC38a2 (SNAT2) ; ↑ poids fœtal	(Jones et al., 2009)
		Souris	HFD+HS	↑ SLC38a2 (SNAT2) ; ↑ poids fœtal	(Rosario et al., 2015)
		Souris	HFD	↑ *Slc38a4* (*Snat4*) (F); ≠ poids fœtal	(King et al., 2013)
		Homme	Obésité	Corrélation: SLC38a2 (SNAT2) & poids à la naissance; ≠ poids fœtal	(Jansson et al., 2013)
		Homme	Obésité	↓ SLC38a4 (SNAT4) ; ≠ poids fœtal	(Farley et al., 2010)
	Système L	Souris	HFD+HS	↑ SLC7a5 (LAT1) ; ↑ poids fœtal	(Rosario et al., 2015)
Lipides	LPL	Homme	Obésité	↑ activité de LPL ; ≠ poids fœtal	(Dube et al., 2012)
	FATP4	Homme	Obésité	↓ SLC27a4 (FATP4); ≠ poids fœtal	(Dube et al., 2012)
	FAT/CD36	Homme	Obésité	↑ CD36 ; ≠ poids fœtal	(Dube et al., 2012)
		Homme	Obésité	↓ *CD36* (M) ; ↑ poids fœtal	(Brass et al., 2013)
	FABP1	Homme	Obésité	↓ FABP1 ; ≠ poids fœtal	(Dube et al., 2012)
	FABP3	Homme	Obésité	↓ FABP3 ; ≠ poids fœtal	(Dube et al., 2012)
	FABP4	Homme	Obésité + GDM / DT2	↑ FABP4 ; ↑ poids fœtal	(Scifres et al., 2011)
	FABP5	Homme	Obésité	↓ *FABP5* (M) ; ↑ poids fœtal	(Brass et al., 2013)
		Homme	Obésité + GDM / DT2	↑ *FABP5* ; ↑ poids fœtal	(Scifres et al., 2011)

Abréviations: HFD+HS - régime hyperlipidique et hypersucré; GDM - diabète gestationnel (gestational diabetes mellitus); DT2 – diabète de type 2; M - mâles; F – femelles; Glut – glucose transporter; SLC – solute carrier (family X, member Y); SNAT - sodium-dependent neutral amino acid transporter; LAT - large neutral amino acid transport; FATP – fatty acid transport protein; LPL – lipoprotein lipase; FAT/CD36 – fatty acid translocase / CD36 antigen; FABP - fatty acid binding protein; ≠ absence d'effet. En *italique* : l'expression génique ; contraire – niveau protéique

Tableau V. Connaissances actuelles sur le conditionnement du phénotype hépatique par l'alimentation maternelle

Abréviations: en PRECONC - en période préconceptionnelle ; GEST - pendant la gestation ; LACT - pendant la lactation ; CONC - la conception ; CD - régime contrôle (*control diet*) ; HFD - régime hyperlipidique (*high-fat diet*) ; DIO - diet induced obesity ; INT - intervention nutritionnelle chez les mères (retour sous le régime CD après le régime HFD) ;
Descendants des mères CD, sous le CD post-sevrage = **CD-CD** ; Descendants des mères HFD, sous le CD post-sevrage = **HFD-CD** ; Descendants des mères CD, sous le HFD post-sevrage = **CD-HFD** ; Descendants des mères HFD, sous le HFD post-sevrage = **HFD-HFD**
FGR - restriction de croissance (*fetal growth restriction*); RCIU - retard de croissance intra utérin; PD - jour post-natal; NAFLD - stéatose hépatique; TG - triglycérides; AG - acides gras; GD - jour gestationnel; LPD - régime pauvre en protéines (*low-protein diet*); TTS - transcription start site
Scd1 - stearoyl CoA-desaturase 1; Pck1 - phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6p - glucose-6 phosphatase; Pgc1α - peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α; Fbp1 - fructose 1,6-bisphosphatase 1; Hnf4α - hepatocyte nuclear factor 4α; Acc1 - Acetyl-CoA carboxylase; Ast- aspartate transaminase; Alt - alanine aminotransferase; Npas2 - neuronal PAS domain protein 2; Cry1 - cryptochrome 1; Rdh12 - retinol dehydrogenase 12; GR - glucocortocoid receptor; Pparα - peroxisome proliferator activated receptor alpha; Aox - Acyl-CoA oxidase; Mecp2 - methyl CpG binding protein 2; Insig2 - Insulin induced gene 2.

Espèce	Environnement maternel	Période du régime	Phénotype hépatique	Effet sur les gènes et voies métaboliques cibles	Epigénétique	Ref.
Mouton	Sur-nutrition *ad libitum* (170-190% de norme) / retour sur la norme de consommation (100%)	4 mois en PRECONC et 1 sem après la CONC, ensuite le transfert d'embryon dans une brebis porteuse. Groupe retour sur la norme de consommation (100%): 1 mois en PRECONC	4 mois: Pas d'effet sur le poids du foie	Sur-nutrition maternelle: Voie d'insuline: down-régulation de niveau de la protéine d'IR, Akt2, pFoxO1. Voie de la néoglucogenèse: down-régulation de l'expression de *Pepck;* down-régulation de l'expression *11bHSD1.* Groupe INT: restauration de niveau de IR, pFoxO1, *Pepck, 11bHsd1* au niveau contrôle	Up-régulation des miARN (miR-103, miR-107, miR-29b), retour au niveau contrôle dans un groupe INT pour miR-107. Pas d'effet de l'obésité sur la méthylation de 3 CpG du promoteur de *Pepck*	Nicholas et al. 2013
Mouton	Sur-nutrition (155% de norme)	GD115 - 124 (période de la croissance rapide)	GD140: pas de différence du poids du foie. PD30: poids du foie augmenté chez les descendants des mères sur-nourris	Down-régulation de l'expression de *Pepck* chez les descendants des mères sur-nourris (dans le foie fœtal et post-natal)	Foie post-natal: pas d'impact de sur-nutrition maternelle sur le niveau de la méthylation du promoteur de *Pepck* (3 CpG étudiés)	Rattanatray et al. 2014
Macaque japonais	HFD 32%	Chronique (2-4 années); Groupe INT: 5ème année, 1 mois en PRECONC	G130 de gestation: NAFLD, stress oxydative. Groupe INT: diminution des TG de 37% par rapport aux HFD, mais pas de restauration complète Descendants (sous le même régime que la mère): accumulation des lipides (PD30, PD180)	Up-régulation des gènes du métabolisme glucidique (Pepck, G6P, Fbp1), ainsi que de facteurs de transcription Pgc1a & Hnf4a; Groupe INT: restauration de l'expression de Pepck, G6P, Fbp1, Pgc1a	-	McCurdy et al. 2009
Primates	HFD 35%	Chronique (2 ans)	Pas de données sur le phénotype du foie	↑expression de Rdh12, ↓ expression de *Npas2*	Fœtus HFD: ↑ H3K14ac, ≠ H3K4me2, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me2; ↓ expression du transcrit & protéique de Hdac1 & son activité enzymatique. ↓ expression de *Hdac1* chez les descendants à PD30	Aagaard-Tillery et al., 2008
Primates	HFD 32%	Chronique (4 ans); Groupe INT: 5ème année, 1 mois en PRECONC	Fœtus (GD130): ↑ expression de la machinerie circadienne (*Per1*, *Reverbα*), normalisation chez les fœtus INT	Expression de Npas2 dans le foie adulte: pas d'effet du régime HFD maternel (entre CD-CD et HFD-CD ou CD-HFD et HFD-HFD)	Foie fœtal: promoteur de Npas2 - pas d'effet du régime HFD maternel sur la méthylation (pyroséquançage bisulfite), mais un surenrichissement en H3K14ac (ChIP-PCP) sous le régime HFD in utero, avec une restauration du niveau chez des fœtus des mères INT	Suter et al. 2011
Rat	HFD 40%, excès calorique, 220 kcal/kg*jour	3 sem en PRECONC	Perturbations des rythmes circadiens (PD35)	HFD-HFD: ↓ expression et amplitude des oscillations de Clock, Bmal1, Cry2, Per1 et Per2; ↓ expression de *Ppara* dans le foie	HFD-HFD: ↑ expression de *Kmt6,* ↓ expression de *Sirt1*; enrichissement de la marque répressive H3K27me3 sur le promoteur de *Pparα*	Borengasser et al. 2014
Rat	LPD / LPD supplémenté en acide folique	GEST	Pas de données sur le phénotype du foie	L'expression de *GR* et de *Ppara* et de *Aox,* le gène cible de *Ppara,* est up-régulée dans le foie des descendants adultes.	PD34: down-régulation de la méthylation des îlots CpG dans les promoteurs de *GR* et de *Ppara.*	Lillycrop et al. 2005
Rat	Régime pauvre en calcium	3 sem en PRECONC, GEST et lactation	-	↓ expression de *Pepck, GR*	↓ niveau de méthylation de *11HSDβ1*, *GR*	Takaya et al. 2013
Rat	LPD / LPD supplémenté en acide folique	GEST	Pas de données sur le phénotype du foie	L'expression de *GR* et de *Pepck,* son gène cible, est up-régulée dans le foie des descendants adultes. L'expression de *Mecp2* est down-régulée.	PD34: hypométhylation du promoteur de *GR* et recrutement de Mecp2, ↓ expression de *Dnmt1* et sa liaison au promoteur du *GR*. Promoteur du *GR* est enrichi en marques activatrices (H3K9ac, H4K9ac, H3K9me) et dépourvu en marque répressives, H3K9me2	Lillycrop et al. 2007
Rat (lignée résistante à DIO)	HFD 45%	GEST	GD21: pas de données sur le phénotype du foie, ↑ glycémie fœtale chez les HFD	↑ expression de *Pepck, G6Pase, Cebpα, Srebp1a, Pgc1α*	↑ de H4ac et de H3K4me2 (région codante & en amont du promoteur de *Pepck*); ↓ des marques répressives H3K9me3 et H3K27me3 (promoteur)	Strakovsky et al. 2011
Souris	HFD 35%	2 sem en PRECONC, GEST, LACT	Pas de données sur le phénotype du foie	↑ enrichissement des promoteurs de *Pparγ*, *Pparα*, *Rxrα* par H3K14ac et H3K9me3 à E18.5. Pas d'effet sur l'expression de ces gènes	↑ de H3K14ac et de H3K9me3 au niveau de TTS des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique à E18.5 et à 5 sem. ↓ expression *Kat2a*, *Hdac1*, *Hdac3* et *Sirt1* à 5 sem	Suter et al., 2014
Souris	HFD 35%	1 sem en PRECONC, GEST, LACT	NAFLD chez HFD-CD (PD28, PD82)	↓ phosphorylation d'IR, IRS, AKT (une insulinorésistance); ↓ FAS, ↑ PEPCK, ↑ phosphorylation de JNK	-	Ashino et al. 2012
Souris	HFD 45%	4 sem en PRECONC, GEST, LACT	NAFLD chez HFD-CD, NASH chez HFD-HFD (30 sem)	↓ de l'activité de la chaine respiratoire mitochondriale; ↑ expression des gènes de lipogenèse (*Fasn, Srebp1c, Dgat1*), de l'inflammation, du stress oxydatif	-	Bruce et al. 2009
Souris	HFD 60%	5 sem en PRECONC, GEST, LACT	Pas de données sur le phénotype du foie	HFD-CD: L'effet du régime maternel sur la transcriptome dans le foie: 158 gènes dérégulés (CD-CD vs. HFD-CD). CD-HFD vs. HFD-HFD: Les voies impactées sont liés à l'inflammation, la synthèse du cholestérol, le métabolisme du glucose, la voie d'activation de LXR. Les facteurs de transcription dérégulés: *Pparg, Reverba, Cebpb.*	Pas d'effet du régime maternel sur la méthylation d'ADN (RRBS/MBD protein isolation-seq)	Cannon et al. 2014
Souris	HFD 35%	HFD (2 sem en PRECONC et jusqu'à E9.5; ou uniquement après E9.5 et jusqu'à E18.5). Groupe INT: après E9.5	Pas de données sur le phénotype du foie; FGR (tous les groupes HFD)	HFD maternel: up-régulation d'*Igf1*, *Igf2*, *Igf1R*, *Pepck*, *G6P*, *GSK3a*; restauration (complète ou partielle) pour le groupe INT.	HFD maternel: up-régulation de *Sirt1*; restauration pour le groupe INT.	Plata et al. 2014
Souris	HFD 18% (graisses animales)	6 sem en PRECONC, GEST, LACT	HFD-CD & HFD-HFD: NAFLD, infiltration par des cellules mononucléaires (36 sem)	-	-	Elahi et al. 2009
Souris	HFD 49%	uniquement GEST; uniquement LACT; GEST & LACT	≠ poids du foie, ↑ des TG dans le foie (NAFLD), ↑ ALT et AST (marqueurs de destruction des hépatocytes) (3 mois)	↑ SREBP1; ↓ GLUT2 (exposition à HFD *in utero* uniquement)	-	Gregorio et al. 2010
Souris	HFD 22% + le lait (55% glucides)	6 sem en PRECONC, GEST, LACT	E18: pas de différence du poids du foie, NAFLD	-	-	Ingvorsen et al. 2014
Souris	HFD 45%	6 sem en PRECONC, GEST, LACT	HFD-CD (PD14): Poids du foie augmenté chez les deux sexes	Altération de la transcriptome dans le foie chez les mâles et femelles HFD-CD, d'une manière différente. Fonctions impactés chez les mâles sont liés au Développement, chez les femelles - au Métabolisme Energétique.	-	Mischke et al. 2013
Souris	HFD (20% de graisse animale) + le lait (55% glucides)	6 sem en PRECONC, GEST, LACT	3 mois: NAFLD; *Ast* plasmatique, marqueur de destruction des hépatocytes, est augmentée	Diminution de protéine de *Irs1* dasn le foie; l'expression de collagène de type 1, marqueur de la fibrogenèse, est up-régulée	-	Oben et al. 2010
Souris	HFD 45%	6 sem en PRECONC, GEST, LACT	Mâles HFD-HFD à 29 sem: augmentation du poids du foie, des TG et du cholestérol hépatique, de *Alt* et *Ast;* stéatohépatite sévère	Up-régulation de lipogenèse *(Srebp1c, Fasn, Acc1);* down-régulation de *Ppara* et *RxRa;* up-régulation des gènes inflammatoires (*Tnfa, Mcp1…)*	L'effet du régime maternel sur la méthylation des CpG dans les gènes suivants: *Ppara, Lpl, LxRa, Pgc1a, Insig2,* et *Fasn*	Pruis et al. 2014
Souris	LPD (6%)	2 sem en PRECONC, GEST	FGR	Descendants sous-nourris *in utero*: horloge circadienne dérégulé (Bmal1, Per2, Rev-erba); dérégulation du métabolisme glucidique (Pepck, G6P) et lipidique (Fasn, Scd1).	-	Sutton et al. 2010
Souris	Exercice physique (environnement enrichi)	4 sem en PRECONC	↓ niveau des TG et CHO (générations F1, F2)	Altération du transcriptome hépatique. ↓ expression des gènes du métabolisme lipidique	Méthylome hépatique altérée (2218 promoteurs et 1438 îlots CpG); corrélation entre la méthylation et l'expression (↓) de 5 gènes du métabolisme lipidique.	Wei et al. 2015

Liste de communications présentées à des congrès

Communications orales :

- ✓ **4ème rencontre du Groupe de la Francophonie Placentaire** (GFP) : Le placenta dans tous ses états, Genève, Suisse (2015).
  "Obésité et perte de poids maternelles : programmation épigénétique dans le placenta et effets sur le phénotype des descendants adultes"

- ✓ **16èmes Journées de l'Ecole Doctorale Physiologie & Physiopathologie**, Paris, France (2015).
  "Feto-placental epigenetic programming of offspring health by maternal obesity and weight loss"

- ✓ **Conférence des Jeunes Scientifiques (Association DocJ de l'INRA)**, Jouy-en-Josas, France (2014).
  "Maternal obesity and weight loss: what about the offspring health?", *présentation en 3 minutes.*

- ✓ **Congrès de la Société Francophone SF-DOHaD**, Nantes, France (2014).
  "Perte de poids maternelle préconceptionnelle : effets sur le développement fœto-placentaire et à long terme"

Communications affichées :

- ✓ **Conference "Epigenetics, Obesity and Metabolism" (Abcam),** Cambridge, England (2015).
  Panchenko, Jouin, Jouneau, Lemaire, Junien, Gabory.
  "Maternal obesity and preconceptional weight loss impact foetal growth and the expression of epigenetic machinery genes"

- ✓ **Congrès de la Société Francophone SF-DOHaD**, Nantes, France (2014).
  1) Lemaire, Jouin, **Panchenko**, Catonné, Baklanov, Prezelin, Junien, Gabory.
  "Conséquences d'une perte de poids maternelle préconceptionnelle sur le phénotype de la descendance" ("Effects of maternal preconception weight trajectory on offspring health")

  2) Jouin, **Panchenko**, Lemaire, Gabory, Junien.
  "Trajectoire pondérale maternelle préconceptionnelle : un modèle murin de perte de poids" ("A mice model of preconceptional maternal weight loss")

- ✓ **Meeting of International Federation of Placenta Associations (IFPA): Fetal placental-maternal crosstalk and pregnancy outcome**, Paris, France (2014).
  Panchenko, Jouin, Jouneau, Lemaire, Junien, Gabory.
  "Sex-specific epigenetic impact of preconceptional maternal weight loss on foeto-placental development"

- ✓ **15èmes Journées de l'Ecole Doctorale Physiologie & Physiopathologie**, Paris, France (2014).
  Panchenko, Gabory, Jouin, Lemaire, Junien.
  "Effects of maternal weight loss after diet induced obesity in the preconceptional period on fetal development, epigenetic programming in placenta and adult phenotype"

- ✓ **14èmes Journées de l'Ecole Doctorale Physiologie & Physiopathologie,** Paris, France (2013).
  Panchenko, Gabory, Guinot, Junien.
  "Epigenomic effects of preconceptional maternal weight trajectories on feto-placental development and in adulthood"

Epigenomic effects of preconceptional maternal ponderal trajectories on fetoplacental development and in adulthood

Polina Panchenko, Anne Gabory, Marine Guinot, Claudine Junien

INRA
UMR 1198
Developmental Biology and Reproduction
78352 Jouy-en-Josas, France
www.inra.fr

Background:

According to the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis, deleterious maternal environment during critical periods of development, may affect developmental programming, leading to an increased susceptibility to chronic diseases, in adulthood.

Recent epidemiological data suggest that maternal **ponderal history during the preconceptional period** can impact fetal growth and pregnancy outcomes. However the potential long terms effects of **preconceptional weight loss** (WL) i.e. how this influences responses to later challenges, and so to risk are not known.

To understand the mechanisms of this programming, our team has focused on two key tissues: placenta and liver. P**lacenta** is a key organ in the mother-fetus relationship and its alteration disrupts fetal development, while **liver** is a central organ in energy homeostasis which can be followed longitudinally from fetal life to adulthood.

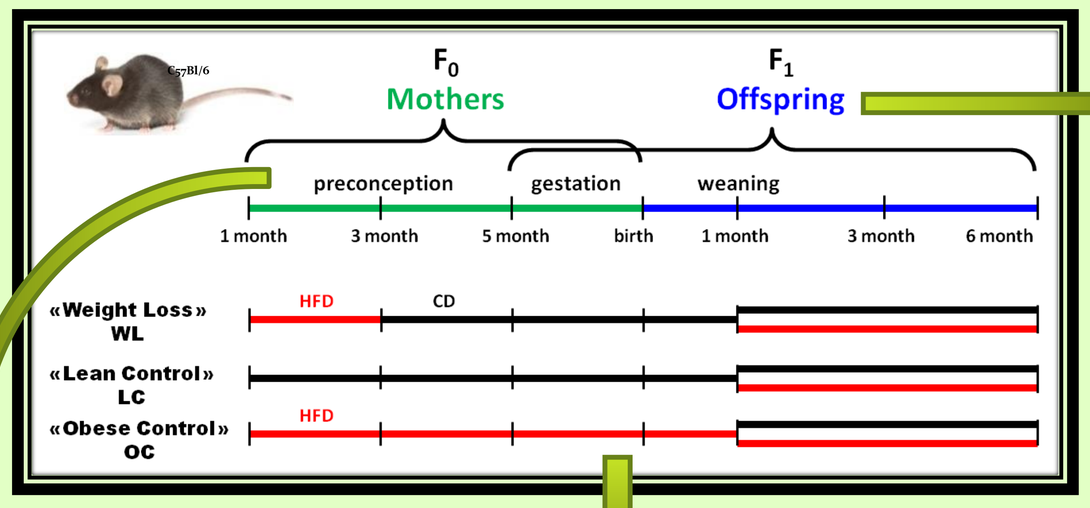
Aims:

To investigate the effects of preconceptional maternal weight loss after diet induced obesity on feto-placental development and on susceptibility of offspring to an obesogenic diet in later life, in a sex-specific manner.

Methods:

Five-week-old C57Bl/6J female mice were fed a **high-fat diet** (HFD) for two months and a **control diet** (CD) during the following two months. Body weight and food intake were recorded twice a week. Oral glucose tolerance test and measures of cholesterol and HDL were performed after 2 and 4 months of preconceptional diet. Lean and obese females were then mated with control males. The embryons were collected by cesarean section at term (at **embryonic day 18**). Fetus and placental weights were recorded. Fetal liver and placenta were collected for further expression and epigenetic studies for investigation of fetal programming molecular mechanisms.

Animal model:

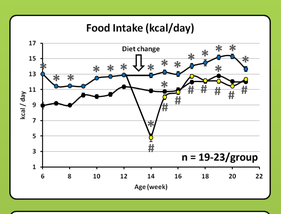


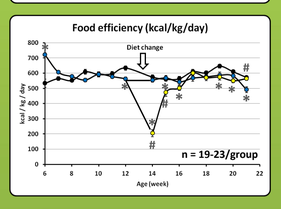
Long term effects

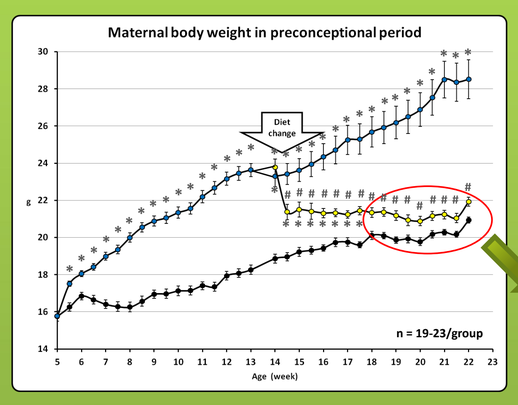
After weaning male and female offspring will be placed under CD or HFD and their body weight and food intake followed until 6 months. **Phenotypic analyses,** including carbohydrate and lipid metabolism, body composition, cardiovascular function and olfactory function, will be carried out on offspring at weaning and at 3 and 6 months. Sexual dimorphism of phenotypic traits and mechanisms at stake will be particularly taken into account.

So far, there are no data showing whether preconceptional maternal weight loss can be beneficial to the offspring. Therefore, this is the first study considering the relationship between early nutritional intervention and adult susceptibility to an obesogenic environment.

After 2 months on a CD, mice normalize their caloric intake and weight







** - Group effect (OC/WL vs. LC)*
 # - Group effect (WL vs. OC)
(p<0.05 ANOVA, Student-Newman-Keuls post-hoc test)

Return to «normal» weight

2 months under a HFD :

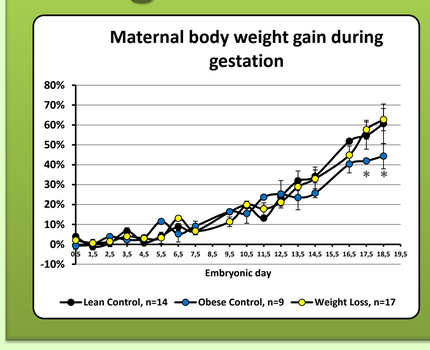
- HFD induce caloric hyperphagia, leading to development of obesity;
- Females showed a **weight gain** of 50% vs. 17% for CD-fed mice.

2 months under a CD :

- WL group is no longer hyperphagic.
- WL mice **lose their excess weight when compared to LC.**

Food efficiency is identical in the 3 groups, indicating that the metabolic rate is not affected.

WL mothers normalize their gestational weight gain at term

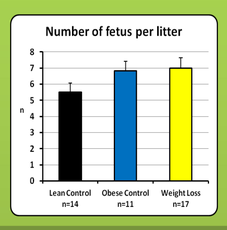


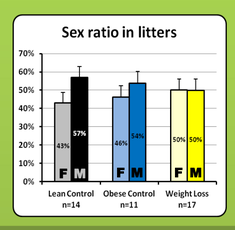
Compared with LC mothers, maternal body weight gain was decreased in OC mothers at term.

WL mothers showed similar weight gain as LC during gestation.

** p<0.05 Kruskal-Wallis test (OC vs. LC, WL)*

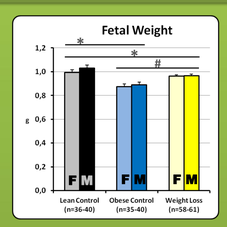
WL fetuses show intermediate weight at term

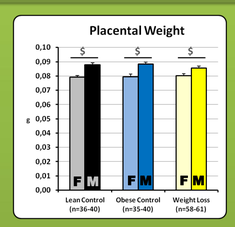


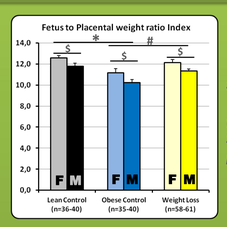


Number of fetuses per litter and sex ratio were not different between LC, OC and WL mothers.

NS (ANOVA)





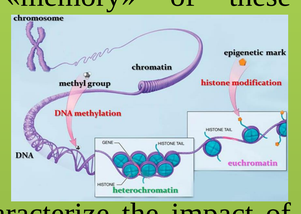


$ - Sex effect
** # - Group effect*
(p<0.05 ANOVA, Student-Newman-Keuls post-hoc test)

E18.5 fetal weight: WL shows intermediate value between OC fetuses and LC fetuses. **Placental weight:** not different between the 3 groups. Sexual dimorphism M > F.
FPI (Fetus to placental weight ratio index = placental efficiency): decreased in OC, restored in WL. Sexual dimorphism M < F.

To do: expression & epigenomic studies

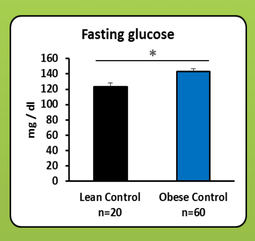
Environmental factors modulate the epigenetic machinery resulting in **epigenetic marks** that represent the long-term «memory» of these impacts.

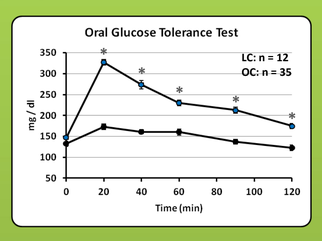


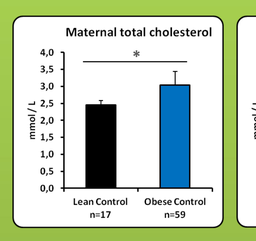
We will characterize the impact of maternal preconceptional WL on epigenetic marks in placenta and fetal liver. First, **epigenetic machinery genes expression** will be analyzed using Taqman custom array. We are currently undergoing a bibliographic review to construct the array. Second, according to the expression results, the relevant **epigenetic mark** will be detected at the **genome-wide level** using a MeDIP-Seq or ChIP-Seq analysis**.**

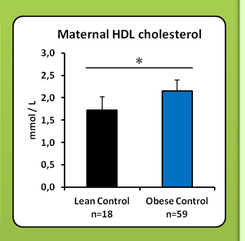
After 2 months on a CD, mice normalize their metabolic parameters

2 months under a HFD :





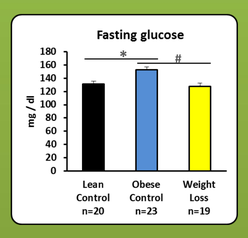


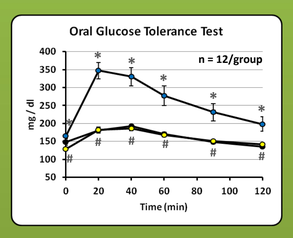


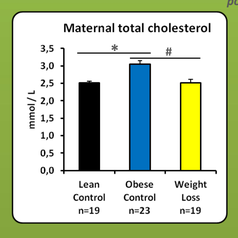
- Females are **hyperglycemic**, **glucose intolerant** and **hypercholesterolemic**.

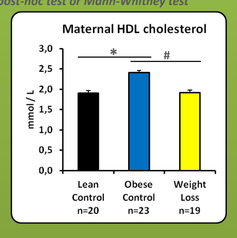
2 months under a CD :

** - Group effect (OC/WL vs. LC)*
 # - Group effect (WL vs. OC)
p<0.05 ANOVA, Student-Newman-Keuls post-hoc test or Mann-Whitney test









- WL females are **normoglycemic**, **glucose tolerant** and **normocholesterolemic**.

Conclusions:

We show that C57Bl/6J female mice placed 2 months under a HFD can achieve obesity followed by a complete weight loss with 2 months under a CD. Thus it represents a good model to study the short- and long-term effects of massive preconceptional weight loss, such as induced by bariatric surgery, in human obese patients. Our findings should provide physiological and molecular mechanisms of fetal programming for developing new prevention strategies to stop the vicious cycle of non-genetic transmission of obesity proneness.

We thank "Unité Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons" for their help on the animal model experiments.

RESEARCH TEAM:
Environmental and developmental origins of epigenetic phenotype in humans and animal

For your questions / suggestions:
Polina PANCHENKO ppanchenko@jouy.inra.fr

Epigenetic effects of preconceptional maternal weight loss on fetoplacental development and in adulthood

Polina Panchenko, Mélanie Jouin, Luc Jouneau, Marion Lemaire, Anne Gabory, Claudine Junien

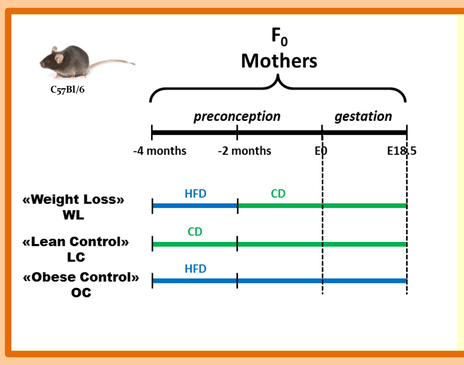
1. Background

According to the **Developmental Origins of Health and Disease** (DOHaD) hypothesis, deleterious maternal environment during critical periods of development, may lead to an increased susceptibility to chronic diseases in adulthood. Whether the currently recommended **preconceptional weight loss** (WL) for obese women is beneficial for the offspring health has not been explored. Obesity, even if corrected before conception, and the WL processes could be "memorized" via epigenetic mechanisms perturbing expression of key developmental genes leading to altered fetal programming. To understand the mechanisms of fetal programming, we focused on placenta, a key organ in the mother-fetus relationship.

2. Aims

To investigate the effects of preconceptional maternal weight loss after diet induced obesity on feto-placental development and on placental gene expression, in a sex-specific manner

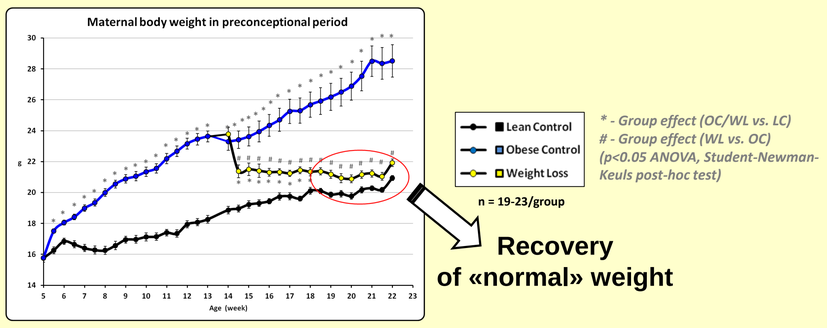
3. Methods



Five-week-old C57Bl/6J female mice were fed a **high-fat diet** (HFD) for two months and a **control diet** (CD) during the following two months. Lean and obese females were then mated with control males. The fetuses were collected at embryonic day 18 and fetal liver and placental labyrinth were kept at -80° for expression and epigenetic studies. Gene expression of epigenetic machinery genes (60) and key developmental genes (32) in the placental labyrinth was studied in male and female mice offspring with RT-qPCR Taqman custom array card (TLDA).

RESULTS

4. After 2 months on a CD, obese mice normalize their weight and metabolic parameters



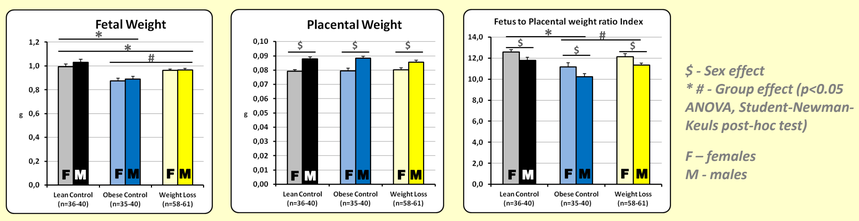
2 months under a HFD :

- Caloric hyperphagia and obesity
- Hyperglycemia, glucose intolerance and hypercholesterolemia

2 months under a CD (WL) :

- Loss of excess weight
- Normalisation: food intake, fasting glucose, glucose tolerance, cholesterol level

5. Fetuses born to WL mothers : slight decrease of birth weight



E18.5 fetal weight

OC fetuses : growth restriction (-13%)

WL fetuses : intermediate value between OC and LC (-5%)

Placental weight

No effect of maternal diet. Sexual dimorphism M > F (9%).

FPI (Fetus to placental weight ratio index = placental efficiency)

OC fetuses : decreased

WL fetuses : completely restored

Sexual dimorphism M < F.

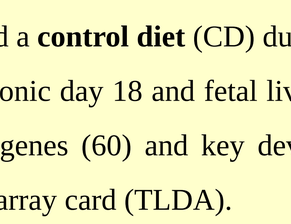
Despite the normalization of maternal weight and metabolic phenotype, birth weight is not restored completely

6. Gene expression in placental labyrinth

Environmental factors modulate the epigenetic machinery resulting in epigenetic marks that represent the long-term «memory» of these impacts. We have found an altered expression of **12 epigenetic machinery genes** and 3 "candidate" genes in placental labyrinth :

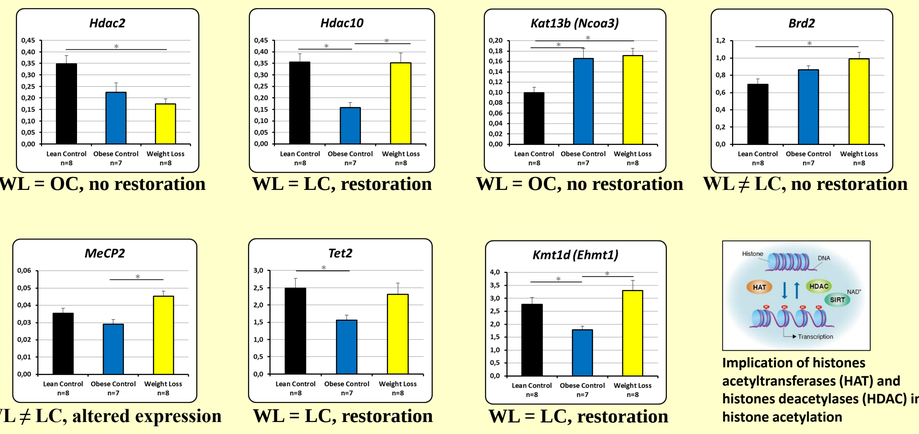
	Gene	Full name	Group 1	Group 2	Effect	Adjusted p-value
Histone acetylation	*Kat1*	Lysine acetyl transferase 1 / Histone aminotransferase 1	LC	WL	↑	0,041
			LC	OC	↑	0,008
	Kat3a	Lysine acetyl transferase 3a / CREB binding protein (Crebbp) / CBP	LC	WL	↑	0,000
	Kat3b	Lysine acetyl transferase 3b / E1A binding protein p300	LC	WL	↑	0,000
			LC	OC	↑	0,000
	Kat13b	Lysine acetyl transferase 13b / Nuclear receptor coactivator 3 (Ncoa3)	LC	WL	↑	0,000
			LC	OC	↑	0,042
	Hdac2	Histone deacetylase 2	LC	WL	↓	0,019
	Hdac3	Histone deacetylase 3	LC	OC	↓	0,005
	Hdac10	Histone deacetylase 10	LC	OC	↓	0,000
			OC	WL	↑	0,032
	Brd2	Bromodomain containing protein 2	LC	WL	↑	0,041
Histone methylation →	*Kmt1d*	Lysine metyl transferase 1d / Euchromatic histone methyltransferase 1 (Ehmt1)	LC	OC	↓	0,027
			OC	WL	↑	0,046
DNA methylation →	*Mecp2*	Methyl CpG binding protein 2	OC	WL	↑	0,019
	Mbd5	Methyl-CpG binding domain protein 5	OC	WL	↑	0,019
Hydroxymethylation →	*Tet2*	Tet oncogene family member 2	LC	OC	↓	0,042
	Irs1	Insulin receptor substrate 1	LC	OC	↓	0,038
	Tph1	Tryptophan hydroxylase 1	LC	OC	↓	0,038
	Hsd11b1	11β-hydroxysteroid dehydrogenase-1	LC	OC	↓	0,040

Table 1 : Imperm Package on R (non parametric test), p<0.05



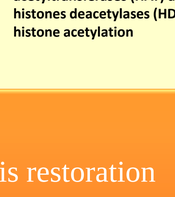
Two major epigenetic marks (DNA methylation and histone modification) that regulate chromatin state

Histone acetylation



WL = OC, no restoration | **WL = LC, restoration** | **WL = OC, no restoration** | **WL ≠ LC, no restoration**

WL ≠ LC, altered expression | **WL = LC, restoration** | **WL = LC, restoration**



Implication of histones acetyltransferases (HAT) and histones deacetylases (HDAC) in histone acetylation

- ✓ **Different patterns of response to maternal diet :** restoration of gene expression in WL placentas / absence of this restoration
- ✓ **Different epigenetic marks potentially can be implicated in placental programming** (histone acetylation, DNA methylation & hydroxymethylation)

7. Long term effects

After weaning male and female offspring were placed under CD or HFD until 6 months to test their susceptibility to an obesogenic environment.

Phenotypic analysis:

- body weight & food intake
- fasting glucose & glucose tolerance
- cholesterol & HDL level
- body composition (adiposity)
- morphometric analysis
- olfactory function…

8. Next : epigenomic studies

Expression of epigenetic machinery genes (placenta, fetal liver)

⇩

Choice of relevant epigenetic mark

⇩

ChIP / MeDIP-seq

⇩

Gene networks

Genome-wide level analysis of relevant epigenetic mark(s) (MeDIP-Seq or ChIP-Seq analysis) according to the expression of epigenetic modifiers.

9. Conclusions:

We show that maternal preconceptional weight loss can partially restore the neonatal phenotype of fetuses in comparison to offspring born to obese mothers. Expression of 12/60 epigenetic machinery genes is altered in the placental labyrinth in response to maternal ponderal trajectories, especially genes playing a role in histone acetylation. This study should uncover potential relationships between early nutritional intervention, placental programming and susceptibility/resilience of adult offspring to an obesogenic environment.

Acknowledgments:

"Unité Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons"

"Plateforme de microgénomique ICE" INRA Jouy-en-Josas

RESEARCH TEAM:
INRA UMR 1198
Developmental Biology and Reproduction
78352 Jouy-en-Josas, France

For your questions / suggestions:
Polina PANCHENKO ppanchenko@jouy.inra.fr

Sex-specific epigenetic impact of preconceptional maternal weight loss on foeto-placental development

Polina Panchenko, Mélanie Jouin, Luc Jouneau, Marion Lemaire, Claudine Junien, Anne Gabory

1. Background

Whether the currently recommended **preconceptional weight loss** (WL) for obese women has an impact on placental development has not been explored. Obesity, even if corrected before conception, and the WL processes could be "memorized" via epigenetic mechanisms perturbing expression of key developmental genes leading to altered fetal programming. To understand the mechanisms of this programming, we focused on **placenta** which plays a key role in fetal growth and development.

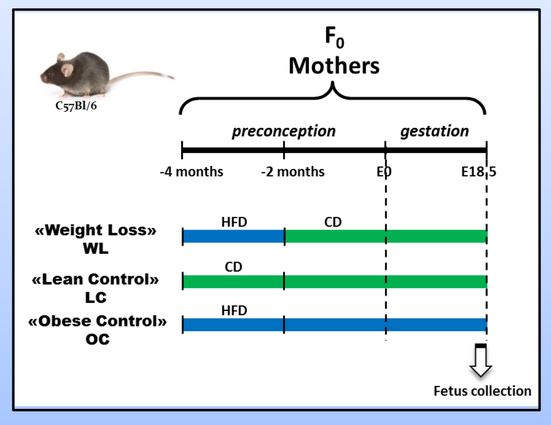
2. Aims

To investigate the effects of preconceptional maternal weight loss after diet induced obesity on feto-placental development and on expression of epigenetic machinery genes in placenta

3. Methods

Five-week-old C57Bl/6J female mice were fed a **high-fat diet** (HFD) for two months and a **control diet** (CD) during the following two months, then mated with control males. The fetuses and placental labyrinth were collected at embryonic day 18.

ANIMAL MODEL :



EXPRESSION STUDY :

Gene expression of epigenetic machinery genes (60) and key developmental genes (32) in the placental labyrinth was studied in male and female mice offspring with RT-qPCR Taqman custom array card (*TaqMan Low-density Array*).

Normalized level of expression of each gene : $X = 2^{(\text{arithmetic mean [Ct(R1), Ct(R2), Ct(R3)] – Ct[X])}}$, where Ct is the threshold cycle, and R1, R2, R3 are the reference genes, *β-actin*, *Mrpl32* and *Sdha*, choosed using geNorm.

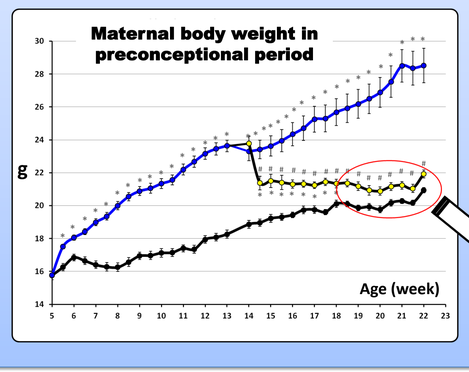
Analysis of differences of expression level between groups : lmperm package in R.

p-Values correction for multiple testing : Benjamini-Hochberg procedure.

Hierarchical clustering computation : Pearson correlation coefficient as distance function, ward as linkage method

4. Results

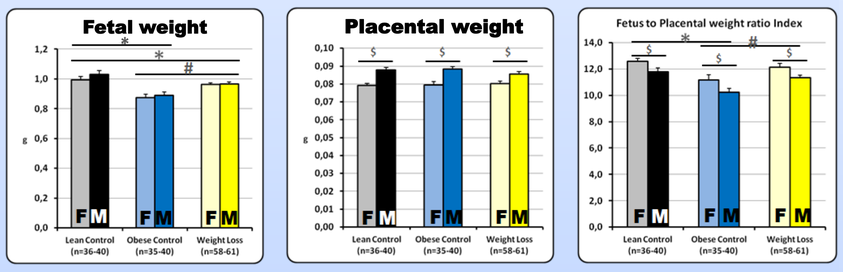
A After 2 months on a CD, obese mice normalize their weight and metabolic parameters



** - Group effect (OC/WL vs. LC)*
 # - Group effect (WL vs. OC)
(p<0.05 ANOVA, Student-Newman-Keuls post-hoc test)

Recovery of «normal» weight in WL group

B Fetuses born from WL mothers: slight decrease of birth weight



OC fetuses : growth restriction (-13%)

WL fetuses : intermediate value between OC and LC (-5%)

No effect of maternal diet

Sexual dimorphism
M > F (9%)

OC fetuses : decreased

WL fetuses : completely restored

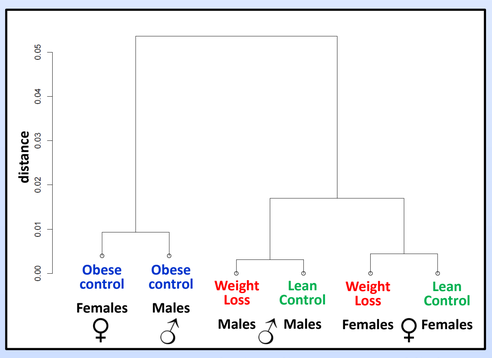
F - females
M - males

$ - Sex effect
** # - Group effect (p<0.05 ANOVA, Student-Newman-Keuls post-hoc test)*

Despite the normalization of maternal weight and metabolic phenotype, birth weight is not restored completely

C Gene expression in placental labyrinth

Hierarchical clustering on mean gene expression



Pearson correlation distance, Ward linkage
Based on mean expression of 92 genes studied

Gene expression in the labyrinth:

- ✓ **LC and WL are grouped together**
- ✓ **OC group is different from WL or LC**

Altered expression of 12 epigenetic machinery genes in placental labyrinth:

	Gene	Full name	Group 1	Group 2	Effect	Adjusted p-value
Histone acetylation	*Kat1*	Lysine acetyl transferase 1	LC	WL	↑	0,041
			LC	OC	↑	0,008
	Kat3a	Lysine acetyl transferase 3a	LC	WL	↑	0,000
	Kat3b	Lysine acetyl transferase 3b	LC	WL	↑	0,000
			LC	OC	↑	0,000
	Kat13b	Lysine acetyl transferase 13b	LC	WL	↑	0,000
			LC	OC	↑	0,042
	Hdac2	Histone deacetylase 2	LC	WL	↓	0,019
	Hdac3	Histone deacetylase 3	LC	OC	↓	0,005
	Hdac10	Histone deacetylase 10	LC	OC	↓	0,000
			OC	WL	↑	0,032
	Brd2	Bromodomain containing protein 2	LC	WL	↑	0,041
Histone methylation →	*Kmt1d*	Lysine metyl transferase 1d	LC	OC	↓	0,027
			OC	WL	↑	0,046
DNA methylation ⇄	*Mecp2*	Methyl CpG binding protein 2	OC	WL	↑	0,019
	Mbd5	Methyl-CpG binding domain protein 5	OC	WL	↑	0,019
Hydroxymethylation →	*Tet2*	Tet oncogene family member 2	LC	OC	↓	0,042

Table 1 : lmperm Package on R, p<0.05

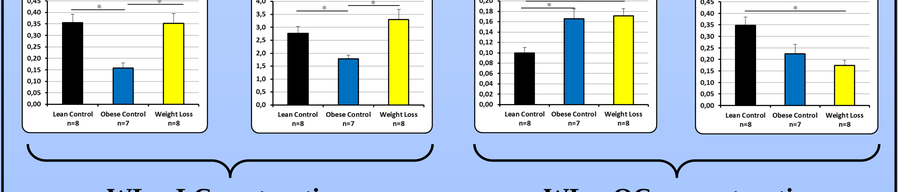
- ✓ **Different epigenetic marks potentially can be implicated in placental programming**

Perspectives : Epigenomic studies

Expression of epigenetic machinery genes (placenta, fetal liver)
⇩
Choice of relevant epigenetic mark
⇩
ChIP / MeDIP-seq
⇩
Gene networks

Genome-wide level analysis of relevant epigenetic mark(s) (MeDIP-Seq or ChIP-Seq analysis) according to the expression of epigenetic modifiers.

- ✓ **Different patterns of response to maternal diet**
  Restoration of gene expression in WL placentas / no restoration



5. Conclusions:

We show that maternal preconceptional weight loss can partially restore the neonatal phenotype of fetuses in comparison to offspring born to obese mothers. Expression of 12 epigenetic machinery genes is altered in the placental labyrinth in response to maternal ponderal trajectories, especially genes playing a role in histone acetylation. This study should uncover potential relationships between maternal obesity, early nutritional intervention and placental programming of adult offspring phenotype.

Acknowledgments:

"Unité Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons"

"Plateforme de microgénomique ICE" INRA Jouy-en-Josas

RESEARCH TEAM:
INRA UMR 1198
Developmental Biology and Reproduction
78352 Jouy-en-Josas, France

For your questions / suggestions:
Polina PANCHENKO ppanchenko@jouy.inra.fr

Conséquences d'une perte de poids maternelle préconceptionnelle sur le phénotype de la descendance

Lemaire Marion*, Jouin Mélanie, Panchenko Polina, Catonné Amandine, Baklanov Alexandr, Soahary Jean-René, Jouneau Luc, Junien Claudine et Gabory Anne

*Marion.Lemaire@rennes.inra.fr

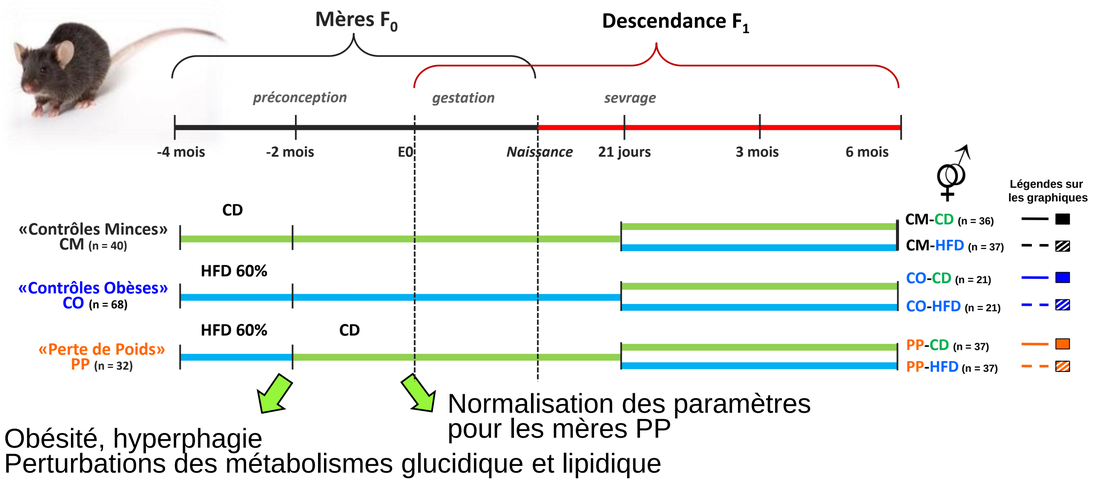
INRA UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas

INTRODUCTION

La prévalence de l'obésité chez les femmes en âge de procréer ne cesse d'augmenter. Lorsque ces femmes désirent concevoir, une perte de poids préconceptionnelle de l'ordre de 5 à 10 % est recommandée. Bien qu'il soit prouvé que cette perte de poids réduise les complications gestationnelles, les conséquences à long terme sur la santé des enfants restent méconnues. Selon le concept de la DOHaD, cette perte de poids pourrait avoir des effets bénéfiques, neutres et/ou délétères à long terme.

L'objectif du projet est d'étudier les effets d'une perte de poids préconceptionnelle sur le phénotype de la descendance adulte femelle et mâle exposée à un environnement maternel délétère.

MATERIEL ET METHODES

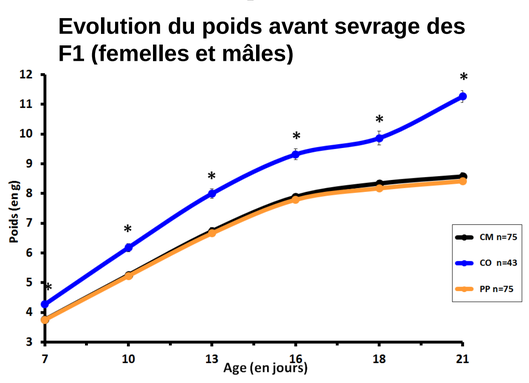


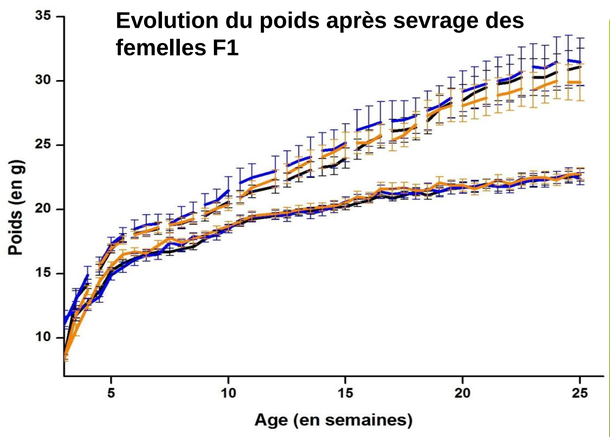
Les souris C57BL/6J du **groupe Perte de Poids** (**PP**) ont reçu pendant **2 mois** un régime hyperlipidique (**HFD**) puis un régime contrôle (**CD**) les **2 mois** suivants. Deux groupes contrôles ont été utilisés : le groupe des contrôles minces (**CM**) et celui des contrôles obèses (**CO**). Les femelles ont ensuite été croisées avec des mâles sous régime standard. Au moment du sevrage, la **descendance mâle et femelle** a été placée **sous régime CD ou HFD**, afin de tester l'effet combiné de la trajectoire pondérale maternelle et de l'environnement obésogène.

Le **poids**, la **prise alimentaire** et la **tolérance au glucose** ont été mesurés durant 6 mois. Lors du sacrifice, la **composition corporelle** a été évaluée par la pesée de divers organes : tissus adipeux blancs sous-cutané, périrénal et périgonadique, reins, cœur, foie et tissu adipeux brun.

RESULTATS

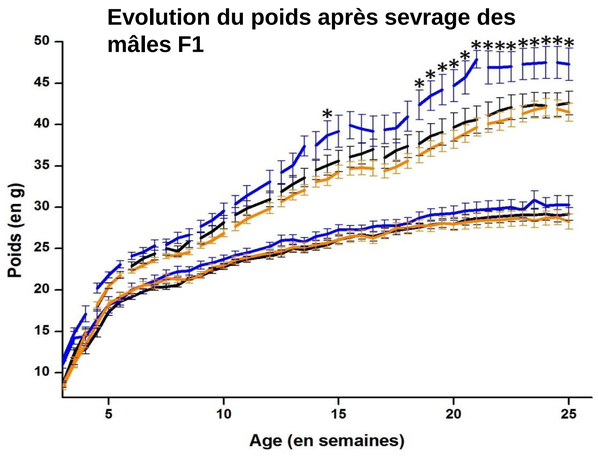
1. Prise de poids





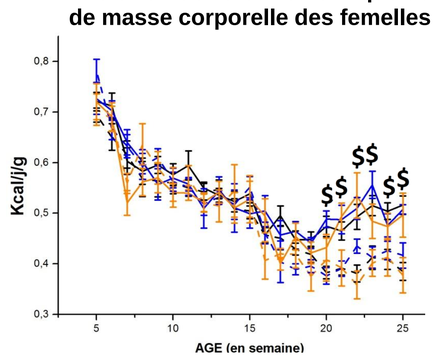
Avant sevrage, un effet du régime maternel apparaît dès 7 jours avec des souriceaux CO plus lourds que les CM et PP. Les CM et les PP présentent en revanche des poids semblables.

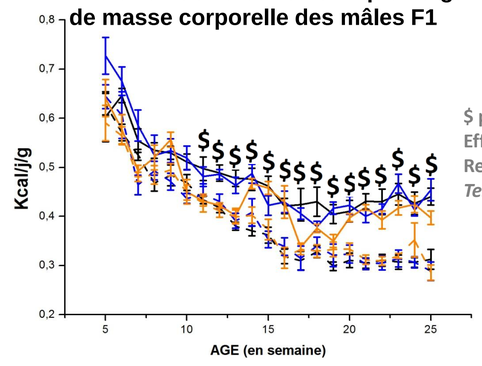
Le régime post-sevrage entraîne un effet rapide et massif sur le poids. Chez les femelles, aucun effet du régime maternel n'est observé. Les mâles de mères CO présentent une obésité aggravée sous régime HFD. Les mâles de mères PP ont des courbes pondérales identiques aux descendants CM.



*p<0.05 CO/PP vs. CM
Repeated Measures ANOVA, test *post-hoc* Duncan

2. Prise alimentaire

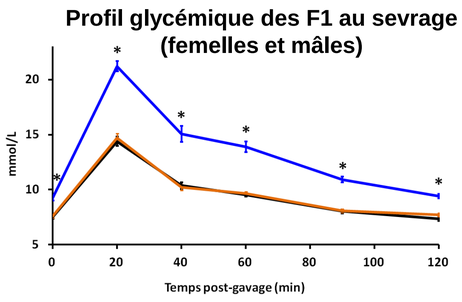




$ p<0.05
Effet du regime CD vs. HFD;
Repeated Measures ANOVA,
Test post-hoc Duncan

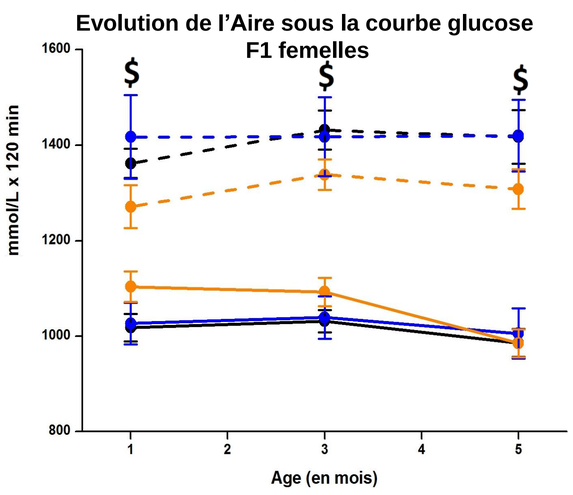
Le régime post-sevrage entraîne une réduction de la valeur calorifique du gain de poids corporel. Aucun effet du régime maternel n'est observé.

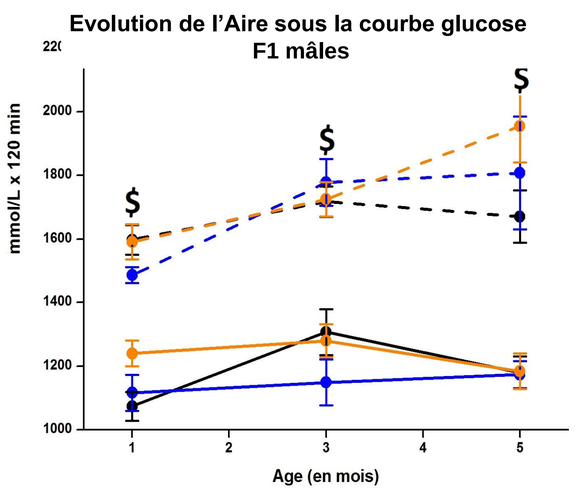
3. Tests oraux de tolérance au glucose



Avant sevrage, il existe un effet du régime maternel, les F1 CO sont hyperglycémique à jeûn et présentent un profil glycémique altéré.

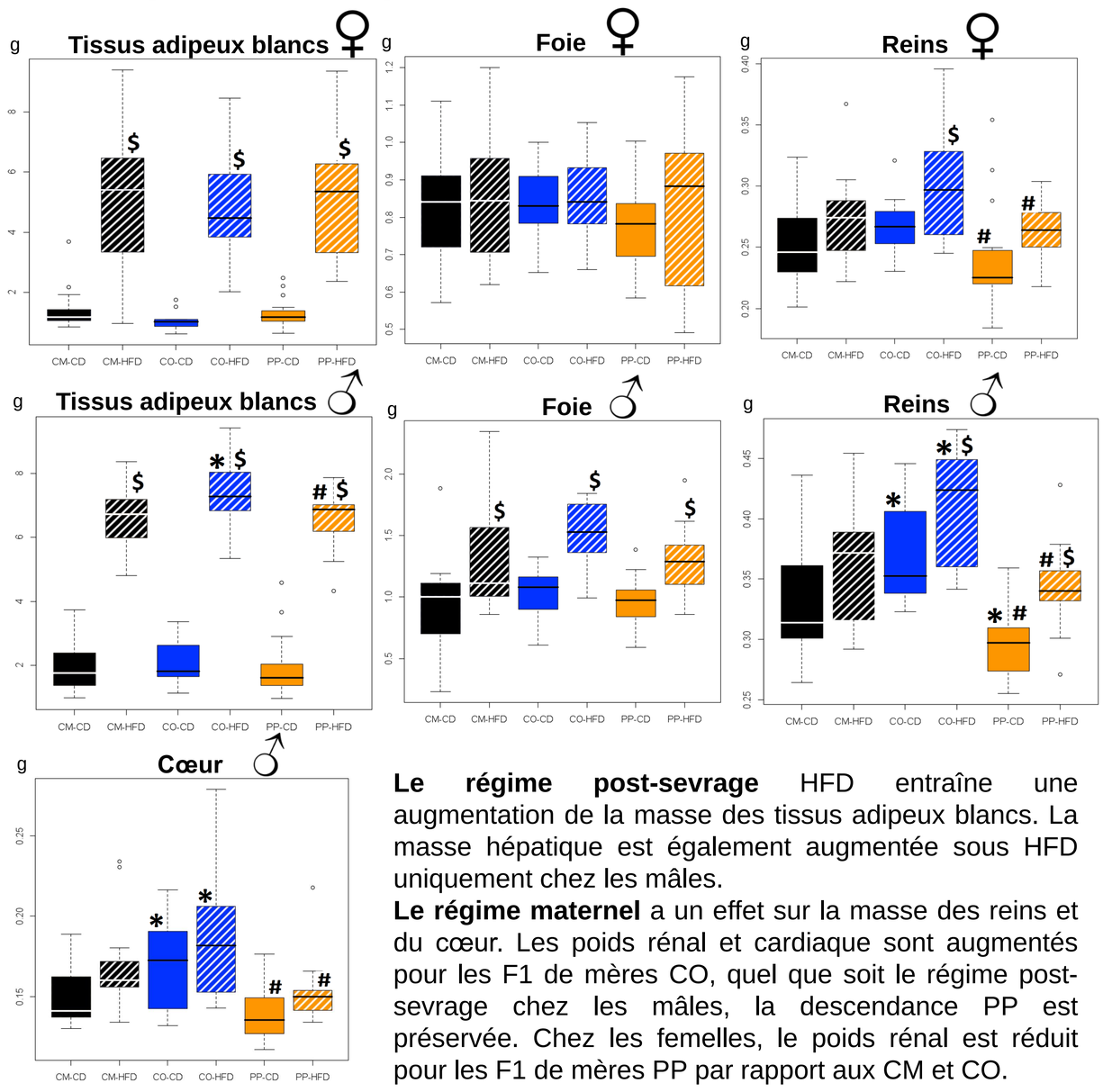
Le régime post-sevrage HFD entraîne une perturbation du métabolisme glucidique, caractérisée par une augmentation de l'aire sous la courbe. Aucun effet du régime maternel n'est observé.





*p<0.05 CO/PP vs. CM; $p<0.05 Effet du regime CD vs. HFD; Repeated Measures ANOVA, test *post-hoc* Duncan

4. Composition corporelle au moment du sacrifice



Le régime post-sevrage HFD entraîne une augmentation de la masse des tissus adipeux blancs. La masse hépatique est également augmentée sous HFD uniquement chez les mâles.

Le régime maternel a un effet sur la masse des reins et du cœur. Les poids rénal et cardiaque sont augmentés pour les F1 de mères CO, quel que soit le régime post-sevrage chez les mâles, la descendance PP est préservée. Chez les femelles, le poids rénal est réduit pour les F1 de mères PP par rapport aux CM et CO.

*p<0.05 CO/PP vs. CM, #p<0.05 CO vs. PP
$p<0.05 Effet du regime CD vs. HFD
Repeated Measures ANOVA, test *post-hoc* Duncan

CONCLUSION

Le régime post-natal a un effet prépondérant sur le poids, le métabolisme glucidique et la composition corporelle des animaux. Un effet du régime maternel a été observé pour le poids et la composition corporelle : les mâles descendants de mères obèses présentent une obésité induite par le régime post-sevrage aggravée, concordant avec une augmentation du poids des tissus adipeux blancs, rénaux et cardiaques. Les descendants de mères ayant perdu du poids se rapprochent des descendants des mères contrôles minces. Une « mémoire » de l'obésité dans ce groupe est présent dans le tissus rénal dont le poids est réduit.

Notre modèle indique un effet délétère de l'obésité maternelle et un effet bénéfique de la perte de poids maternelle préconceptionnelle. Ces résultats devront être complétés avec une analyse phénotypique plus approfondie. Par ailleurs, des analyses épigénétiques seront engagées pour appréhender les mécanismes moléculaires de programmation sous-jacents.

Remerciements à l' "Unité Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons" pour l'entretien des animaux et leur assistance tout au long de ce projet.

TRAJECTOIRE PONDERALE MATERNELLE PRECONCEPTIONNELLE : UN MODELE MURIN DE PERTE DE POIDS

Mélanie Jouin*, Polina Panchenko, Marion Lemaire, Luc Jouneau, Anne Gabory, et Claudine Junien
INRA UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas.
*melanie.jouin@jouy.inra.fr

INTRODUCTION

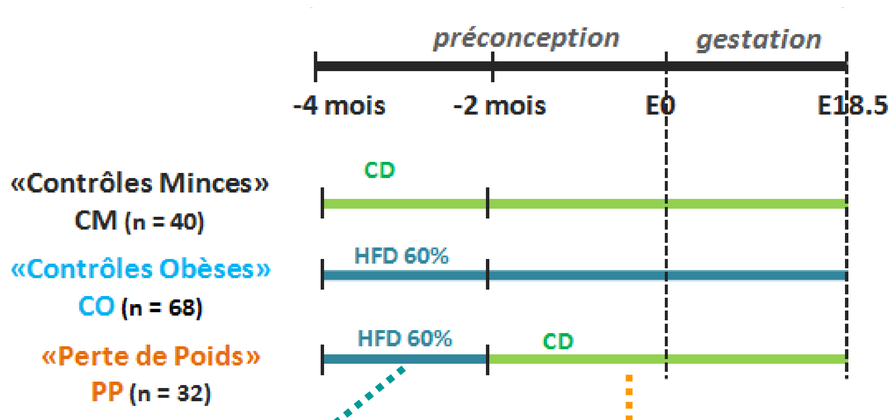
En France, de plus en plus de femmes en âge de procréer sont en surpoids ou obèses (25%). Afin de réduire les risques d'infertilité et de complications obstétricales, ces femmes sont encouragées à perdre du poids avant même de démarrer une grossesse par des mesures alimentaires, d'activités physiques, voire chirurgicales. Cependant les conséquences de cette perte de poids sur le développement du fœtus et sur la santé des enfants à long terme n'ont pas encore été explorées.

L'objectif de ce travail est de développer et caractériser un modèle murin de perte de poids maternelle préconceptionnelle (PP), ayant une pertinence pour l'humain. Ce modèle consiste en un gain de poids (régime obésogène) suivi d'une perte de poids, basée sur un régime alimentaire équilibré, entraînant un retour à un poids "normal", conformément aux pratiques cliniques actuelles. Les conséquences physiologiques de ces différentes expositions nutritionnelles ont été étudiées en caractérisant la trajectoire pondérale, le comportement alimentaire, le phénotype métabolique et la composition corporelle de nos souris « Mères ».

Grâce à ce modèle, nous souhaitons analyser si cet environnement nutritionnel et métabolique de la mère avant la conception a des effets bénéfiques, délétères ou non significatifs sur la descendance.

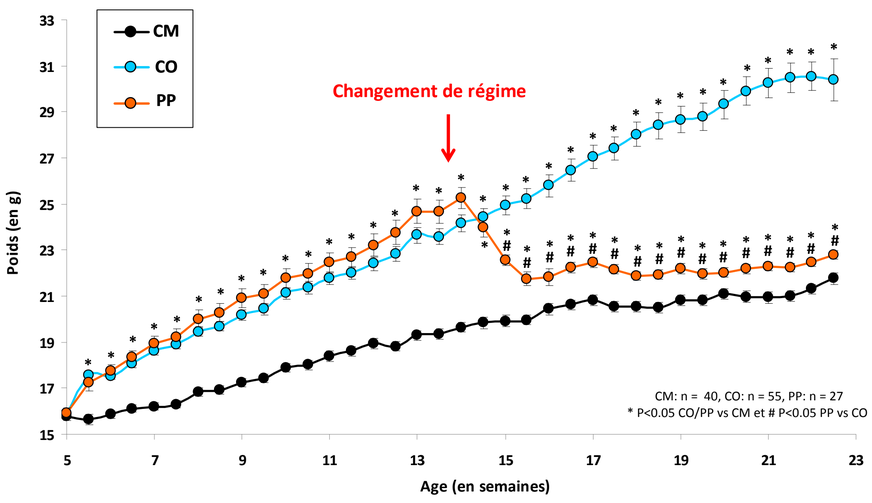
MATERIELS ET METHODES

A l'âge de 5 semaine, les souris C57Bl6/J reçoivent un régime hyperlipidique (High Fat Diet, HFD) pendant 2 mois, provoquant l'obésité, puis un régime contrôle (Control Diet, CD) pendant 2 mois, entraînant une perte de poids. Ce groupe « Perte de Poids" (PP) sera comparé à deux groupes contrôles : un groupe de femelles « Contrôles Minces" (CM), recevant un régime CD pendant 4 mois et un groupe « Contrôles Obèses" (CO), recevant un régime HFD pendant cette même période. Pendant la gestation et la lactation, les mères des groupes PP et CM seront maintenues sous CD, et celles du groupe CO sous HFD. Après le sevrage des descendants, les mères sont sacrifiées et différents tissus prélevés (tissus adipeux, foie, reins cœur) pour évaluer leur composition corporelle et de leur adiposité.



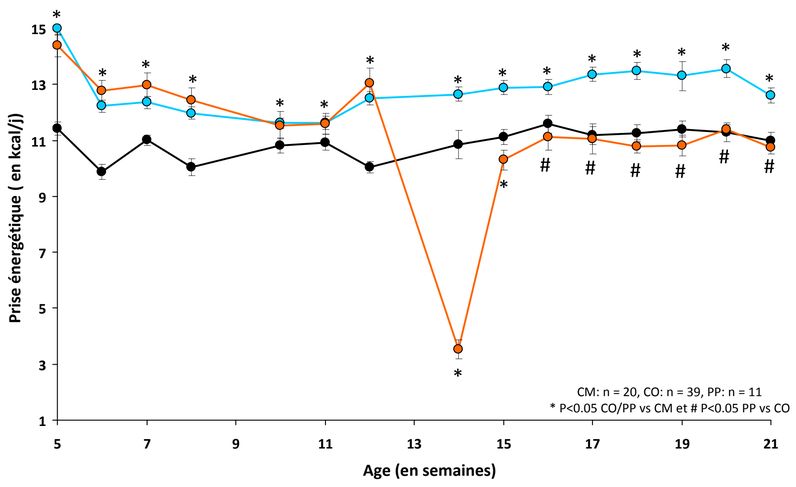
RESULTATS

1. Prise de poids



- 2 mois sous HFD: obésité (+ 43%)
- Changement de régime: perte de poids rapide et massive
- 4 mois de régime: surpoids (+5%)

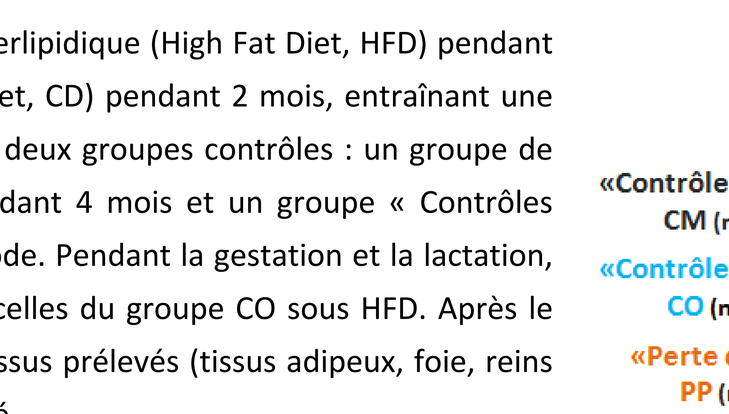
2. Prise alimentaire

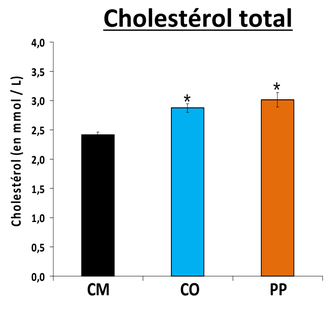


- 2 mois sous HFD: Hyperphagie quant à la consommation calorique
- Après le changement de régime : Normalisation de la prise alimentaire

3. Métabolisme glucidique et lipidique

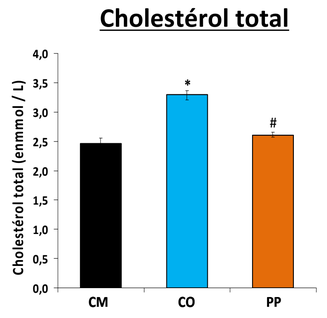
Après 2 mois sous régime HFD





CM: n = 18, CO: n = 24, PP: n = 15, * P<0.05 CO/PP vs CM.

Après la perte de poids



CM: n = 18, CO: n = 20, PP: n = 11, * P<0.05 CO/PP vs CM, et # P<0.05 PP vs CO.

- 2 mois sous HFD: hyperglycémie à jeun, intolérance au glucose et hypercholestérolémie
- Souris PP: restauration de ces paramètres

4. Composition corporelle

Groupe	Glycémie à jeun (mg/dl)	Poids des tissus (g)				
		TA blancs	TA brun	Reins	Cœur	Foie
CM (n = 17)	119 ± 4,24	1,20 ± 0,10	0,093 ± 0,01	0,28 ± 0,00	0,14 ± 0,00	1,20 ± 0,05
CO (n = 12)	136 ± 7,18	4,84 ± 0,52*	0,15 ± 0,05	0,31 ± 0,01	0,15 ± 0,01	1,13 ± 0,05
PP (n = 13)	127 ± 6,97	1,35 ± 0,09#	0,11 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,15 ± 0,01	1,13 ± 0,04

* P<0.05 CO/PP vs CM
# P<0.05 PP vs CO

- Souris CO: adiposité plus élevée que souris CM et PP
- Souris CM et PP: composition corporelle équivalente

CONCLUSION

Deux mois de régime HFD suivis de deux mois de régime CD ont permis d'induire une obésité puis une perte de poids importante (14%) chez nos femelles C57Bl/6J. Cette perte de poids s'approche de celle actuellement recommandé aux femmes enceintes, à savoir 5 à 10%. Dans ce modèle, la perte de poids est massive et rapide. Les souris PP conservent un léger surpoids mais présentent un phénotype métabolique et une composition corporelle « équivalents » aux femelles CM .

Ce modèle de perte de poids préconceptionnelle, maintenant bien caractérisé au niveau phénotypique et métabolique, permettra d'étudier l'effet de la dynamique pondérale maternelle sur le développement fœtal et la santé de la descendance à long terme, ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Remerciements à l'Unité Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons pour l'entretien des animaux et leur assistance tout au long de ce projet.

Maternal obesity and preconceptional weight loss impact foetal growth and the expression of epigenetic machinery genes

Polina E. Panchenko[1,2], Mélanie Jouin[1], Luc Jouneau[1], Sarah Voisin[1,2], Audrey Prezelin[1], Hélène Jammes[1], Claudine Junien[1] and Anne Gabory[1]

[1]INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, F-78352 Jouy-en-Josas, France
[2]Ecole Doctorale 394 "Physiologie, physiopathologie et thérapeutique", Université Pierre et Marie Curie, 75252 Paris, France

Background

Maternal obesity associates with increased risks for metabolic and obstetrical complications, but also impacts foetal growth and organogenesis. In humans, maternal obesity associates with macrosomia or foetal growth restriction (FGR). FGR often results from insufficient nutrient and oxygen supply due to disturbed placental function. Little is known about the molecular mechanisms underlying obesity-induced FGR.

P**reconceptional weight loss** (WL) is currently recommended to obese women to increase fertility. Nevertheless, few studies have assessed its consequences on foetal growth and gene expression.

The **epigenetic marks** are known to be affected by FGR. The effect of maternal diet-induced obesity or WL on the epigenetic machinery regulating the epigenetic processes needs further investigation.

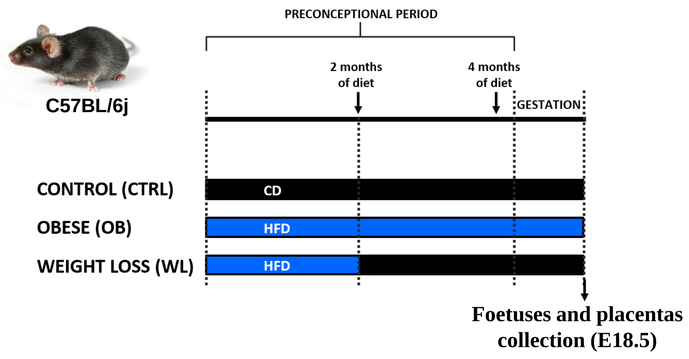
Aims

✓ **To investigate the effects of maternal obesity on foeto-placental growth and on the expression of epigenetic machinery genes**

✓ **whether preconceptional weight loss could alleviate these effects.**

Methods

Experimental design



CD - control diet (10% lipids, 70% carbohydrates, 20% proteins)
HFD - high-fat diet (60% lipids, 20% carbohydrates, 20% proteins)

Expression study

- **60 genes of the epigenetic machinery**
  - Histone acetylation:
    - 9 lysine acetyltransferases (KATs),
    - 18 histone deacetylases (HDACs),
    - 2 bromodomain-containing proteins (BRDs),
  - 5 DNA methyltransferases (DNMTs),
  - 5 methyl-binding domain proteins (MBDs),
  - 3 enzymes of DNA hydroxymethylation (TETs)
  - 7 lysine demethylases (KDMs),
  - 7 lysine methyltransferases (KMTs),
  - 4 arginine methyltransferases (PRMTs),

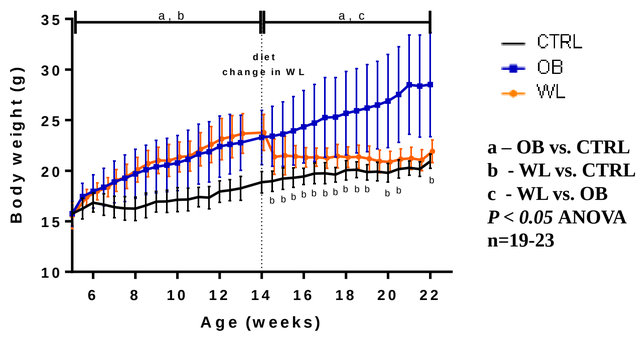
RT-qPCR custom TaqMan Low-density Array

384 wells / 96 genes / 4 samples / array

- **Tissues:** foetal liver, placental labyrinth and junctional zone

Maternal phenotype

HFD induces severe obesity and switching to a CD allows weight loss



a – OB vs. CTRL
b - WL vs. CTRL
c - WL vs. OB
***P* < *0.05* ANOVA**
n=19-23

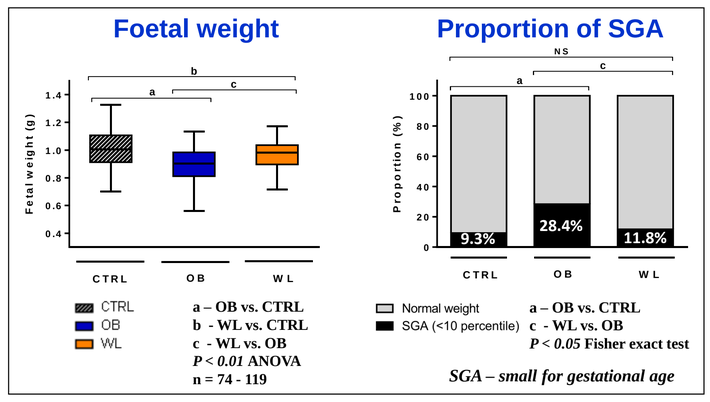
After 4 months of preconceptional diet:

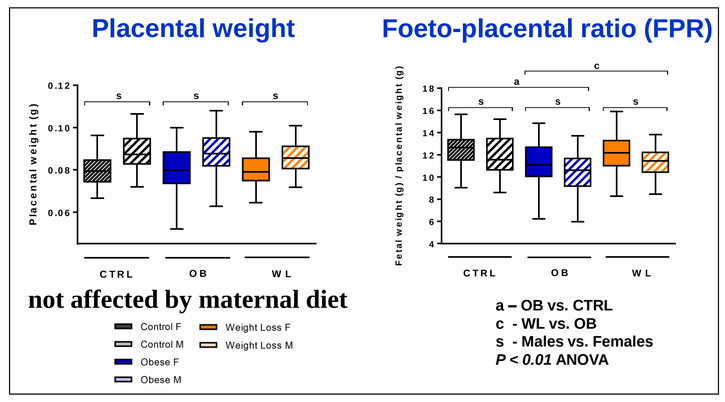
OB females: Obesity (36% heavier than CTRL), hyperglycaemia, glucose intolerance, hypercholesterolemia

WL females: Normalisation of metabolic parameters, yet remain 5% heavier than CTRL

Foeto-placental phenotype

Maternal obesity induces foetal growth restriction, while preconceptional WL allows partial restoration of foetal weight





OB group:
Reduced foetal weight (-13%)
Reduced placental efficiency (FPR)

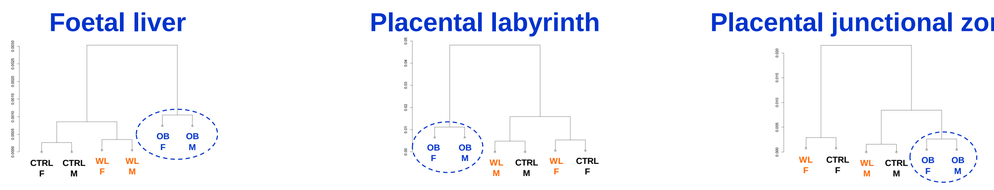
WL group:
Partial restoration of foetal weight (-5%),
Restoration of placental efficiency (FPR)

Gene expression in foetal liver and placenta

Maternal obesity alters gene expression in foetal liver and placental labyrinth, while preconceptional weight loss restores it

Hierarchical clustering of mean expression

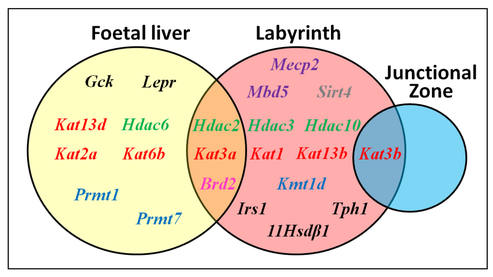
Pearson correlation distance – Ward linkage



OB group: Separation between OB group and CTRL group in liver and labyrinth
WL group: Restoration of gene expression in the three tissues

Maternal obesity and weight loss alter the expression of epigenetic machinery genes

Differentially expressed genes



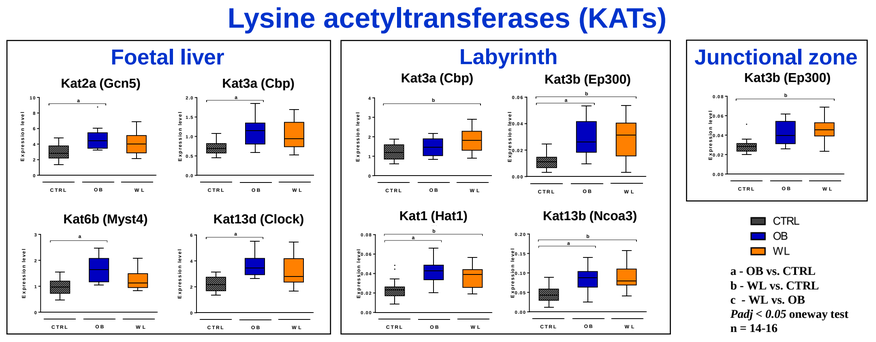
One third (18 / 60) of the epigenetic genes are differentially expressed

Histone acetylation machinery is particularly sensitive:

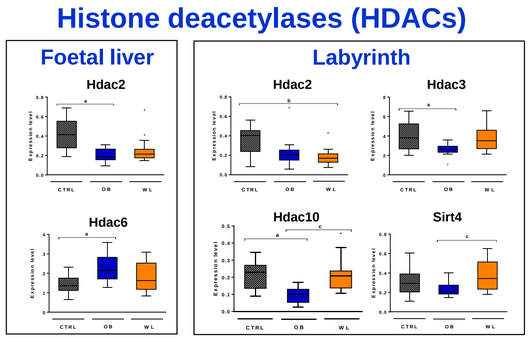
- ✓ **Liver - *78%* (7/9 of differentially expressed epigenetic genes)**
- ✓ **Labyrinth - *75%* (9/12 genes)**
- ✓ **Junctional zone - *1/1 gene***
- ✓ **Common genes: liver vs. labyrinth (3)**
  labyrinth vs. junctional zone (1)

The expression of histone acetylation modifiers in response to maternal OB and WL

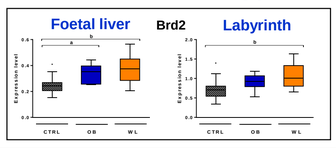
Lysine acetyltransferases (KATs)



Histone deacetylases (HDACs)



Bromodomain-containing protein



	Writers: KATs		Erasers: HDACs		Readers: *Brd2*	
	OB	WL	OB	WL	OB	WL
Foetal liver	↑	Restoration	↑ or ↓	No restoration / Restoration	↑	No restoration
Placental labyrinth	↑	No restoration	↓	No restoration / Restoration	≠	Up-regulation
Junctional zone	≠	Up-regulation	–	–	–	–

OB group: *KATs* and *Brd2* are up-regulated; most *HDACs* are down-regulated

WL group: Normalisation of expression only for a subset of genes

Conclusions

In our mouse model, **maternal obesity induced FGR** and reduced placental efficiency at term. These phenotypic changes were associated with alterations of the expression of epigenetic machinery genes in foetal liver and placenta. This study highlights the **high sensitivity of epigenetic machinery genes, especially genes encoding histone acetylation modifiers, to maternal metabolism**. Preconceptional nutritional intervention inducing **weight loss appeared beneficial to foetal growth** and induced an adaptation at the transcriptional level.

This is the first report of epigenetic mechanisms in relation to obesity-induced FGR, emphasizing **the role of the balance between writers and erasers of epigenetic marks** in this pathology. Obesity or WL-induced transcriptional changes could alter the placental or the hepatic epigenome.

Research team:
INRA Developmental Biology and Reproduction
Jouy-en-Josas, France

For your questions:
Polina PANCHENKO ppanchenko@jouy.inra.fr

Acknowledgments:

- Unité Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons (INRA)
- Plateforme de microgénomique ICE (INRA)
- Unité NeuroBiology of Olfaction (INRA)

Эпигенетическая память у потомков матерей страдающих ожирением или сбросивших вес до зачатия

Резюме

Согласно концепции "программирования развития", также известной как "*Developmental Origins of Health and Disease*" (DOHaD), различные факторы окружающей среды, действующие во время раннего развития организма, могут иметь долгосрочное влияние на взрослый фенотип. Материнское ожирение влияет на рост плода и на фенотип взрослого потомства. Потеря веса рекомендована пациенткам, страдающим ожирением, ещё до зачатия. Тем не менее, в настоящее время неизвестно, какое влияние оказывает резкое похудение, вызванное строгой диетой, на развитие плаценты и плода, а так же на здоровье детей во взрослом возрасте.

Целью данной кандидатской работы было изучить влияние материнского ожирения и потери веса, до зачатия, на фенотип плода в конце беременности и на взрослое потомство, так же как и на экспрессию генов в плаценте и в эмбриональной печени. У мышей, страдающих ожирением, наблюдалась задержка развития плодов на 18 эмбриональный день (перед рождением). У матерей, которые нормализовали свой вес до зачатия, благодаря смене диеты, вес плодов практически вернулся к норме.

Материнское ожирение оказало значительное влияние на экспрессию генов, задействованных в эпигенетических механизмах, в плаценте и в эмбриональной печени. Эпигенетические механизмы регулируют экспрессию генов и, следовательно, фенотип клетки, не затрагивая последовательности ДНК. Гены, играющие роль в ацетилировании гистонов, были особенно подвержены влиянию ожирения. Потеря веса матери позволила восстановить уровень экспрессии только части этих генов.

Эта работа также показала, что взрослое мужское потомство ожиревших мышей, в случае питания жирной диетой, набирает вес быстрее, чем потомство мышей, питающихся сбалансированной пищей. Похудение матери позволило отменить данное негативное "программирующее" влияние ожирения на потомство.

В результате данной кандидатской работы было установлено, что экспрессия генов, регулирующих эпигенетические процессы, подвержена влиянию материнской среды, в частности ожирению. Нормализация веса до зачатия позволяет смягчить и даже отменить негативное воздействие ожирения на потомство. Тем не менее, некоторые патологические эффекты сохраняются в фенотипе плода, даже после излечения ожирения у матери до зачатия. Данная работа позволяет лучше понять механизмы "программирования развития", вызванные материнским ожирением.

Ключевые слова:

Эпигенетика, Программирование развития; Developmental Origins of Health and Disease; Материнское ожирение; Потеря веса; Жирное питание; Задержка роста плода; Плацента; Ацетилирование гистонов; Взрослое потомство.

Epigenetic memory of maternal preconceptional weight trajectories during development and adulthood

Summary

Maternal obesity (OB) impacts fetal growth and adult offspring phenotype. It is still unknown whether the currently recommended preconceptional weight loss (WL) for obese women is beneficial for feto-placental growth and adult offspring health.

The objectives of this thesis were to assess the effects of maternal weight trajectories on offspring phenotype at term and in adulthood, as well as gene expression in placenta and fetal liver. At E18.5, fetuses from obese females presented a fetal growth restriction (FGR); this FGR was almost completely abolished by maternal WL. Placental and hepatic expression of epigenetic machinery genes was affected by maternal OB, especially the histone acetylation pathway. Maternal WL normalized the expression of only a subset of these genes. Males born to OB mothers gained weight faster under high-fat diet than males born to control mothers; maternal WL rescued this phenotype.

These results show that expression of epigenetic machinery genes and in particular histone acetylation regulators, is highly sensitive to maternal obesity. Preconceptional WL alleviates the effects of OB on fetal and adult weight but some effects of obesity cured by nutritional intervention were retained in offspring phenotype at term. This study is an important step toward understanding the mechanisms linking maternal nutrition to fetal growth and adult health.

Keywords:

Nutritional epigenetic conditioning; Maternal obesity and weight loss; Developmental Origins of Health and Disease; Feto-placental development; Fetal growth restriction; Histone acetylation machinery; Adult offspring phenotype

Résumé

L'obésité maternelle peut prédisposer aux pathologies métaboliques à l'âge adulte. Une perte de poids préconceptionnelle est recommandée aux femmes obèses, mais ses effets sur la croissance fœto-placentaire et la santé de la descendance adulte sont encore peu connus. Les objectifs de cette thèse étaient d'étudier les effets des trajectoires pondérales maternelles sur le phénotype de la descendance à terme et à l'âge adulte, ainsi que sur l'expression génique.

Les descendants de mères obèses présentent une restriction de croissance fœtale, associée à des altérations d'expression des gènes de la machinerie épigénétique dans le foie fœtal et le labyrinthe placentaire. Notre étude souligne la sensibilité particulière de la machinerie d'acétylation des histones au métabolisme maternel. À l'âge adulte, les mâles nés des mères obèses développent une obésité aggravée lorsqu'ils sont exposés à un environnement obésogène.

La perte de poids maternelle préconceptionnelle améliore la croissance fœtale et normalise le poids à l'âge adulte. Elle est donc bénéfique pour la descendance. Cependant, certains effets de l'obésité, corrigée par l'intervention nutritionnelle, sont conservés car le poids fœtal et l'expression d'une partie de gènes restent altérés.

Ce travail apporte des premiers éléments sur les mécanismes du conditionnement développemental par les trajectoires pondérales maternelles.

Mots clés:

Epigénétique nutritionnelle; Origines développementales de la santé et des maladies ; Obésité maternelle; Perte de poids préconceptionnelle; Développement fœto-placentaire; Restriction de croissance fœtale; Acétylation des histones; Phénotype métabolique