

Effets multigénérationnels d'une exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel pendant la gestation sur le développement foeto-placentaire dans un modèle lapin

Sarah Valentino

▶ To cite this version:

Sarah Valentino. Effets multigénérationnels d'une exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel pendant la gestation sur le développement foeto-placentaire dans un modèle lapin. Biologie de la reproduction. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT: 2016SACLA013. tel-01546312v2

HAL Id: tel-01546312 https://theses.hal.science/tel-01546312v2

Submitted on 23 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





NNT: 2016SACLA013



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

ECOLE DOCTORALE N° 581 Agriculture, alimentation, BIologie, Environnement, Santé (ABIES)

Biologie de la reproduction

Par

Melle VALENTINO Sarah

Effets multigénérationnels d'une exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel pendant la gestation sur le développement fœto-placentaire dans un modèle lapin

. . _ . _ . .

Thèse présentée et soutenue à Jouy en Josas, le 24 Novembre 2016 :

Composition du Jury :

Pr. MARANO, Francelyne	Professeur émérite, Université Paris Diderot	Présidente du jury
Dr. ALFAIDY, Nadia	Directrice de recherche, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble	Rapporteur
Pr. HAGEN-PICARD, Nicole	Professeure, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse	Rapporteur
Pr. GIL, Sophie	Professeure, Université Paris Descartes	Examinatrice
Dr. PERY, Alexandre	Directeur de l'école doctorale ABIES	Examinateur
Dr. CHAVATTE-PALMER, Pascale	Directrice de recherche, INRA	Directrice de thèse
Dr. TARRADE, Anne	Chargée de recherche, INRA	Co-encadrante de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr. Nicole Hagen-Picard et le Dr. Nadia Alfaidy d'avoir accepté d'examiner la qualité de ce manuscrit de thèse, le Pr. Francelyne Marano, Dr. Sophie Gil et Dr. Alexandre Pery pour votre participation au jury. Merci pour le temps que vous avez accordé à la lecture et à l'appréciation de cette thèse ainsi que pour votre présence à Jouy-en-Josas. J'aimerais également remercier le Dr. Rémy Slama et Dr. Henri Schroeder pour vos conseils statistiques et vos regards avisés au cours des réunions du comité de thèse, ainsi que le Dr. Flemming Cassee pour sa participation au dernier comité de thèse. Je tiens à remercier particulièrement Rémy Slama de m'avoir accueillie quelques jours dans votre laboratoire à Grenoble afin de travailler sur le modèle statistique.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Alexandre Pery, directeur de l'école doctorale ABIES, pour votre bonne humeur, votre soutien, vos conseils et contacts pour mon avenir professionnel et la confiance que vous m'avez accordée avec le Dr. Irina Vassileva pour faire partie de l'équipe d'organisation des journées de l'école doctorale 2016.

Je ne remercierai jamais assez le Dr. Pascale Chavatte-Palmer pour tout ce que tu m'as apporté. Tout d'abord merci de m'avoir accueilli dans ton équipe et de m'avoir fait confiance pour cette thèse. Ton soutien, ton encadrement et ta patience ont été sans faille malgré la gestion délicate de mon stress. Merci de m'avoir fait découvrir ta vision du monde scientifique en partageant tes connaissances. Ton enthousiasme, ta gentillesse, ton écoute et le temps que tu m'as accordé malgré tes multiples engagements ont fait de cette thèse une belle aventure.

Un grand merci au Dr. Anne Tarrade pour ton calme, ta patience, ta gentillesse, tes explications et tes corrections toujours aussi pointilleuses. Un merci particulier accompagné d'excuses pour la gestion de mon stress parfois trop extériorisé. Je te remercie également pour toutes les heures passées devant le logiciel Biogazelle ou encore toutes celles passées à l'interprétation des sorties GSEA.

Remerciements

Un grand merci à l'UCEA et particulièrement à Jean-Pierre Albert, Gwendoline Morin, Franck Tribouillard et Didier Mauchand pour votre accueil au moment de l'expérimentation animale, votre gentillesse et votre bonne humeur au quotidien. Nous aurons passés « quelques » heures ensemble, pour ne pas dire 3 mois, au début de ma thèse, merci de m'avoir aidé à la commencer dans les meilleures conditions possibles.

Je tiens à remercier Michèle Dahirel pour tous les bons moments partagés au laboratoire et en dehors. Nos repas du Mardi midi au bureau, nos « tea time » et nos discussions sur la vie me manquent déjà. Tu auras été d'une aide inestimable pour l'expérimentation animale, nous en aurons manipulé des lapines ! Je tiens également à remercier Marie-Christine Aubrière et Marie-Sylvie Lallemand pour tous les bons moments et rires partagés au laboratoire. Vos conseils et votre aide technique sont inestimables.

Merci au Dr. Delphine Rousseau-Ralliard pour toutes les analyses des profils en acides gras, les compétences et les connaissances que tu as bien voulu partagé avec moi. Ton énergie débordante, les discussions sur tout et rien et les marches sur la pause du midi (« Mais si on va marcher ça fait du bien de faire du sport ») m'ont permis de penser à autre chose que la thèse le temps d'un instant. Un grand merci pour ton aide, tes relectures et la co-écriture du deuxième article (« La discussion n'est jamais finie, on aura toujours plus de questions »).

Je remercie également Josiane Aioun pour toutes les analyses en microscopie électronique. Merci du temps que tu m'as accordé pour m'aider à comprendre ce monde, qui est le tien, de la microscopie électronique.

Un grand merci à Eve et Christophe pour le temps que vous avez passé à échographier les lapines. Merci à Eve pour toutes les explications sur ta spécialité qu'est l'imagerie. Merci à Christophe pour ton calme, ta gentillesse et ta disponibilité.

Je tiens à remercier tous les doctorants et stagiaires qui sont passés dans cette équipe. Tout d'abord Pauline Peugnet et Pauline Léveillé, je me sentais tellement petite à côté de vous qui étiez déjà bien avancées dans vos thèses respectives quand je suis

Remerciements

arrivée. J'ai eu la chance de vous voir réussir brillamment et voler vers d'autres horizons. Un grand merci à Pauline Peugnet pour ta minutie dans les relectures de cette thèse. Merci à Morgane Robles qui est encore en thèse et qui je le sais la finira de la meilleure des manières. Je tiens à te remercier particulièrement pour le soutien mutuel que l'on s'est accordé mais surtout de m'avoir permis de m'évader quelques mois sur le dos de ta jument (Princesse Fiona). Merci aux stagiaires de Master 2 qui ont travaillé sur le projet EPAPP, Jérôme Dorival (Exposition et microscopie) et Julie Dechartres (Placenta F2). D'autres sont passés au sein de l'équipe avec qui j'ai passé d'excellents moments au laboratoire et en dehors comme Pauline Hoarau, Jérôme Delmotte, Emilie Nouveau et Marine Dizabeau. #LesSushisC'estLaVie.

Merci également aux autres membres de l'équipe ER4 Marine Guinot et le Dr. Sylvaine Camous pour les moments partagés au laboratoire, sur le plan technique et sur le plan gustatif au cours des pique-niques et autres réunions accompagnées de nos productions du jour.

Je tiens également à remercier le Dr. Corinne Cotinot pour son accueil au sein l'unité Biologie du Développement et Reproduction. Un grand merci à tous les membres de l'unité BDR, vous avez partagé avec moi, à un moment ou un autre, un conseil, eut une discussion ou tout simplement un sourire qui m'a réconforté. Un merci particulier au Dr. Madia Charlier et Etienne Aujean pour la manipulation des lapines et au Dr. Olivier Sandra pour cet abattage le 24 Décembre 2013 (« Joyeux Noël »).

Je tiens également à remercier le Dr. Véronique Duranthon et Catherine Archilla pour les analyses transcriptomiques des placentas.

Un grand merci à Luc Jouneau pour ton courage face à mes questions de non expert sur les analyses bioinformatiques. Merci pour ton aide et les heures passées devant GSEA ou IPA afin de trouver le meilleur moyen d'analyser ces données de transcriptomique. Je me souviendrai toujours de ta tête lorsque je t'ai montré mes fameuses « Enrichment maps » pour la première fois.

Un grand merci également au Dr. Lydiane Agier, merci d'avoir tenu le coup face à mes mails incessants intitulés « Petite question stats », « Encore une petite question stats », « Encore et toujours les stats » ou encore « AU SECOURS R ne tourne pas » ! Merci pour ta gentillesse et ton accueil lors de mon passage à Grenoble.

Je tiens à remercier chaleureusement mon oncle et ma tante pour votre accueil et votre hébergement pendant plusieurs mois. Merci à mon oncle Joël Doré pour ton soutien et nos discussions scientifiques (à l'origine d'une collaboration) au cours de mes différents stages et de ma thèse à l'INRA. Merci à mes cousins et cousine pour m'avoir fait découvrir la vie parisienne et pour avoir été là quand j'ai eu besoin de vous.

Un grand merci à mes grands-parents pour votre soutien, vos conseils et votre confiance en moi. Merci d'être là pour m'aider à avancer et pour m'expliquer ce qu'est la vie.

Un énorme merci à mes amis pour leur soutien inestimable tout au long de la thèse et surtout au moment des retours difficiles vers la région parisienne, même si je vous rappelle que je ne suis pas « parisienne » mais « limougeaude expatriée à Paris ».

Le plus grand des merci à mes parents. Votre soutien a été sans faille malgré mon caractère, mes doutes, mes peurs et les périodes difficiles. Depuis toujours vous me donnez la force d'avancer, la force de vivre, vous m'avez toujours poussé à accomplir mes rêves, et aujourd'hui j'espère vous rendre fière. Merci à ma petite sœur pour ce que tu es, pour ton soutien et ta patience face à mes doutes, ton épaule pour pleurer, ton sourire qui aide à avancer et les moments rugby qui remontent le moral. Merci à mon grand frère d'avoir été présent pour se soutenir mutuellement face à ce monde inconnu qu'était la région parisienne. Ton mariage et la naissance de ma nièce et mon neveu ont été des moments inoubliables et surtout une grande bouffée d'air frais dans cette vie polluée (#FinDeThèseRimeAvecJeuxDeMotsPourris).

Merci à mon petit chat et à mes poneys de me supporter au quotidien, de me réconforter dans les moments difficiles, mais surtout de me permettre de m'évader.

Une dernière pensée à mon arrière grand-mère...

Liste des publications	4		
Liste des illustrations			
Liste des abréviations			
Introduction générale			
	-		
Partie A : Introduction	17		
 Origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte ou DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 	47		
1.1. Concept d'origines développementales de la santé	17		
1.2. Programmation développementale du syndrome métabolique	10		
1.3. Programmation développementale et épigénétique	. ,		
1.4. Effets intergénérationnels	-) 25		
	_)		
2. Pollution atmosphérique	29		
2.1. Composition et sources de la pollution atmosphérique	29		
2.2. Gaz d'échappement de moteur diesel	34		
2.3. Etudes des effets des gaz d'échappement de moteur diesel sur la santé	38		
2.4. Réglementations et recommandations	39		
3. Placenta	42		
3.1. Structure du placenta	42		
3.2. Vascularisation et flux sanguins placentaires	46		
3.3. Transferts transplacentaires	51		
3.4. Fonction endocrine placentaire	58		
3.5. Plasticité placentaire en réponse à l'environnement maternel	62		
4. Effets d'une exposition gestationnelle aux polluants			
atmosphériques et aux nanoparticules manufacturées sur la			
descendance	68		
4.1. Etudes épidémiologiques	68		
4.2. Modeles annaux 4.3. Effets intergénérationnels et transgénérationnels	72 81		
5. Transfert transplacentaire des particules	84		

- 1 -

 5.1. Taille des particules 5.2. Charge des particules 5.3. Forme des particules 5.4. Absence de transfert transplacentaire des particules 5.5. Mécanismes de transfert transplacentaire des particules 6. Objectifs de la thèse	84 85 86 87 89
Partie B : Matériels et méthodes	Q1
1. Expérimentation animale	91
1.1. Choix du modèle animal – le lapin	91
1.2. Exposition par inhalation	92
1.3. Protocole expérimental – Deux générations	94
2. Suivi de la croissance fœto-placentaire	95
2.1. Echographies	95
2.2. Biométrie fœto-placentaire à 28 jpc	97
3. Le placenta	97
3.1. Structures et ultrastructure placentaires	97
3.2. Expression génique placentaire	99
4. Métabolisme maternel et fœtal	100
5. Biochimie des lipides – Profils en acides gras	101
6. Modèle statistique	102
Partie C : Résultats de l'étude	105
1. Article 1 : Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in	
rabbits	106
2. Résultats complémentaires sur la première génération	126
2.1. Profils en acides gras	126
2.2. Expression génique placentaire	130
3. Article 2 : <i>In utero</i> exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function, fatty acids profile and fetal metabolism of the second generation in rabbits	134

Pai	rtie D : Bilan, discussion et perspectives	180
1.	Projet EPAPP – résumé de l'ensemble des données	180
	1.1. Travaux de thèse	180
	1.2. Travaux du projet EPAPP	184
2.	Discussion et mise en perspective des résultats obtenus	189
	2.1. Concentration utilisée pour l'exposition	189
	2.2. Puissance, fonctionnement et émission du moteur diesel	189
	2.3. A sont dus les effets sur les unités fœto-placentaires F1 ?	190
	2.4. Comment expliquer les effets sur la deuxième génération ?	191
	2.5. Mise en perspective de ces travaux par rapport aux données épidémiologiques	107
	eh	192
3.	Forces et limites de cette étude	193
	3.1. Choix du modèle lapin	193
	3.2. Exposition	193
4.	Perspectives	197
	4.1. Dosages	197
	4.2. Caractérisation des nanoparticules	198
	4.3. Epigénétique	198
	4.4. Projet Brain AirPoll	200
	4.5. Métagénomique intestinal	200
5.	Impact sociétal	201
Pai	rtie E : Conclusion	202
An	nexes	204
Ré	férences	212

Liste des publications relatives aux travaux de thèse

Articles originaux

Valentino S.A., Tarrade A., Aioun J., Mourier E., Richard C., Dahirel M., Rousseau-Ralliard D., Fournier N., Aubrière M-C., Lallemand M-S., Camous S., Guinot M., Charlier M., Aujean E., Al Adhami H., Fokkens P.H., Agier L., Boere J.A., Cassee F.R., Slama R., Chavatte-Palmer P. (2016). Maternal exposure to diesel exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits. Particle and Fibre Toxicology 26;13(1):39. DOI: 10.1186/s12989-016-0151-7, IF:8.649

Valentino S.A., Ralliard-Rousseau D., Aubrière M-C., Dahirel M., Lallemand M-S., Archilla C., Mourier E., Richard C., Guinot M., Aioun J., Camous S., Fournier N., Slama R., Duranthon V., Cassee F.R., Tarrade A., Chavatte-Palmer P. *In utero* exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function, fatty acid profile and fetal metabolism of the second generation in rabbits. (en préparation pour une soumission dans PLOS One)

Revues

Hougaard, K. S., Campagnolo, L., Chavatte Palmer, P., Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D.,
Valentino, S., Park, M. V., de Jong, W. H., Wolterink, G., Piersma, A. H., Ross, B. L.,
Hutchison, G. R., Hansen, J. S., Vogel, U., Jackson, P., Slama, R., Pietroiusti, A., Cassee, F.
R. (2015). A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles.
Reproductive Toxicology, 56, 118-140. DOI : 10.1016/j.reprotox.2015.05.015, IF:3.227

Valentino S., Tarrade A., Chavatte-Palmer P. (2016) Exposition aux gaz d'échappement diesel durant la gestation: quelles conséquences sur le développement foetoplacentaire ? Apport des modèles animaux. Bull. Acad. Vét. France, 169.

Communications orales dans des congrès à comité de lecture

Valentino S., Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Dahirel M., Aujean E., Mourier E., Richard C., Aubrière M-C., Dorival J., Chaffaux S., Camous S., Boere J.A., Fokkens P.H., Aioun J., Lallemand M-S., Maulny L., Slama R., Cassee F.R., Chavatte-Palmer P. **Maternal exposure**

to diesel engine exhaust during pregnancy affects fetal and placental growth. "Meeting on reproductive effects of airborne particles" workshop, 13/03/2014, Amsterdam, Pays-Bas.

Valentino S., Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Dahirel M., Aujean E., Mourier E., Richard C., Aubrière M.C., Dorival J., Chaffaux S., Camous S., Boere A.J.F., Fokkens P.H.B., Aïoun J., Lallemand M.S., Maulny L., Slama R., Cassee F., Chavatte-Palmer P. L'exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel au cours de la gestation affecte le développement fœto-placentaire : validation du modèle lapin. 3^{ème} rencontre du Groupe de la francophonie placentaire (GfP), 8-9/09/2014, Paris.

Valentino S.A., Tarrade A., Aioun J., Mourier E., Richard C., Dahirel M., Rousseau-Ralliard D., Fournier N., Aubrière M-C., Camous S., Guinot M., Lallemand M-S., Charlier M., Aujean E., Al Adhami H., Fokkens P.H., Agier L., Boere J.A., Cassee F.R., Slama R., Chavatte-Palmer P. Rabbit as a model for maternal exposure to diesel engine exhaust. Sharing Advances on Large Animal Models (SALAAM), 13-16/12/2015, Poznan, Pologne.

Valentino S., Duranthon V., Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Mourier E., Richard C., Dahirel M., Aioun J., Daniel N., Archilla C., Peynot N., Fournier N., Guinot M., Jolivet G., Faure C., Bourdon M., Torres-Rovira L., Jouneau L., Charlier M., Aujean E., Boere J., Agier L., Cassee F., Slama R., <u>Chavatte-Palmer P.</u> **Reproductive effects of gestationel exposure to diesel exhaust in a rabbit model.** 18th International Congress on Animal Reproduction, 26-30/06/2016, Tours.

Posters dans des congrès à comité de lecture

<u>Valentino S.</u>, Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Dahirel M., Aujean E., Mourier E., Richard C., Aubrière M-C., Dorival J., Chaffaux S., Camous S., Boere J.A., Fokkens P.H., Aioun J., Lallemand M-S., Maulny L., Slama R., Cassee F.R., Chavatte-Palmer P. Maternal exposure to diesel engine exhaust during pregnancy affects fetal and placental growth: validation of a rabbit model. *The Power of Programming*, 13-15/03/2014, *Munich*, *Allemagne*.

Valentino S., Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Dahirel M., Aujean E., Mourier E., Richard C., Aubrière M-C., Dorival J., Chaffaux S., Camous S., Boere J.A., Fokkens P.H., Aioun J.,

Lallemand M-S., Maulny L., Slama R., Cassee F.R., Chavatte-Palmer P. L'exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel au cours de la gestation affecte le développement fœto-placentaire : validation du modèle lapin. Colloque de l'Association pour la Recherche en Toxicologie (ARET) – « Eco- Géno-Toxicologie des nanomatériaux : bilan et perspectives », 3-4/06/2014, Paris.

Valentino S., Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Dahirel M., Aujean E., Mourier E., Richard C., Aubrière M-C., Dorival J., Chaffaux S., Camous S., Boere J.A., Fokkens P.H., Aioun J., Lallemand M-S., Maulny L., Slama R., Cassee F.R., Chavatte-Palmer P. Maternal exposure to diesel engine exhaust during pregnancy affects fetal and placental growth: validation of a rabbit model. Société française de la DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), 7-8/11/2014, Nantes.

Valentino S., Dahirel M., Mourier E., Archilla C., Richard C., Daniel N., Maulny L., Peynot N., Canon E., Slama R., Cassee F., Tarrade A., Duranthon V., Chavatte-Palmer P. Maternal exposure to diesel engine exhaust during pregnancy affects early embryo development in a rabbit model. 41st annual conference of the International Embryo Technology Society (IETS), 10-13/01/2015, Versailles.

Valentino S., Tarrade A., Aioun J., Mourier E., Richard C., Dahirel M., Rousseau-Ralliard D., Fournier N., Aubrière M-C., Lallemand M-S., Camous S., Guinot M., Charlier M., Aujean E., Al Adhami H., Fokkens P.H., Agier L., Boere J.A., Cassee F.R., Slama R., Chavatte-Palmer P. In utero diesel exhaust exposure induces altered placental vascularization, placental nanoparticles transfer and intergenerational effects. 55th annual meeting of Society of Toxicology (SOT), 13-17/03/2016, Nouvelle-Orléans, Etats-Unis.

Valentino S., Rousseau-Ralliard D., Aubrière M-C., Dahirel M., Lallemand M-S., Archilla C., Jouneau L., Mourier E., Richard C., Guinot M., Aioun J., Camous S., Fournier N., Slama R., Duranthon V., Cassee F.R., Tarrade A., Chavatte-Palmer P. In utero exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function, fatty acids profiles and fetal metabolism of the second generation in rabbits. 3^{ème} congrès de la Société française de la DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), 1-2/12/2016, Paris.

Liste des illustrations

Liste des figures

Partie A : Introduction

Chapitre 1 : DOHaD

Figure A.1 : Origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte

Figure A.2 : ADN et marques épigénétiques

Figure A.3 : Effets intergénérationnels

Chapitre 2 : Pollution atmosphérique

Figure A.4 : Tailles des particules atmosphériques (échelle logarithmique)

Figure A.5 : Succession des réactions chimiques aboutissant à la libération d'ozone dans l'atmosphère

Figure A.6 : Concentrations troposphériques en ozone et oxydes d'azote en zones rurales et urbaines

Figure A.7 : Mécanisme de combustion du gasoil dans un moteur diesel

Figure A.8 : Composition de la phase particulaire PM_{2,5}

Figure A.9: Représentation schématique des particules présentes dans les gaz d'échappement diesel

Chapitre 3 : Le placenta

Figure A.10 : Le placenta : à l'interface entre la mère et le fœtus

Figure A.11 : Anatomie utérine comparée

Figure A.12 : Du blastocyste au conceptus : formation des membranes

Figure A.13 : Classification histologique des placentas hémochoriaux

Figure A.14 : Classification morphologique des placentas

Figure A.15 : Photo d'un placenta de lapin à 28 jours de gestation

Figure A.16 : Formation des villosités placentaires dans le placenta humain

Figure A.17 : Le placenta humain – Morphologie et circulation sanguine

Figure A.18 : Villosités placentaires dans le placenta humain

Figure A.19 : Différents types de flux sanguins materno-fœtaux

Figure A.20: Différents types de transport transplacentaire à travers le syncytiotrophoblaste

Figure A.21 : Corrélation entre la glycémie maternelle et fœtale dans différentes espèces

Figure A.22 : Transport transplacentaire du glucose à travers le syncytiotrophoblaste

Figure A.23 : Voie de signalisation mTOR

Figure A.24 : Principaux transporteurs transplacentaires des acides aminés au niveau du syncytiotrophoblaste

Figure A.25 : Transport transplacentaire des acides gras à travers le syncytiotrophoblaste

Figure A.26 : Transport transplacentaire du fer à travers le syncytiotrophoblaste

Figure A.27 : Facteurs de croissance - IGFs dans le syncytiotrophoblaste

Figure A.28 : Adaptations placentaires à l'environnement maternel

Chapitre 4 : Effets d'une exposition gestationnelle aux gaz d'échappement de moteur diesel ou à des nanoparticules manufacturées

Figure A.29 : Schéma expérimental de l'étude Veras et al., 2008, chez la souris

Partie B : Modèle expérimental et analyses

Figure B.1: Evènements majeurs de la différenciation gonadique dans trois espèces d'intérêt

Figure B.2 : Expérimentation animale

Figure B.3 : Présentation des dispositifs de contention pour l'exposition

Figure B.4 : Présentation de la salle d'hébergement des lapines à l'INRA de Jouy-en-Josas

Figure B.5 : Habituation des lapines au flux d'air

Figure B.6 : Schéma de fonctionnement du MAPCEL

Figure B.7: Echographies d'un conceptus de lapin à 7, 14, 21 et 28 jpc grâce à un échographe Voluson ®

Figure B.8 : Mesures biométriques fœtale à 28 jpc

Figure B.9 : Dissections des unités fœto-placentaires à 28 jpc

Figure B.10 : Histologie et stéréologie sur les placentas de lapin à 28 jpc

Figure B.11 : Photographie d'une coupe ultrafine d'un placenta de lapin à 28 jpc

Partie C : Résultats de l'étude

Figure C.1: Analyse d'enrichissement (GSEA) sur les placentas F1 à 28 jpc

Partie D : Bilan, discussion et perspectives

Figure D.1: Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour le développement fœtoplacentaire F1

Figure D.2 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour le développement fœtoplacentaire F2

Figure D.3 : Présentation des différents intervenants du projet EPAPP

Figure D.4 : Photographie d'une coupe ultrafine d'un placenta de lapin à 28 jpc

Figure D.5 : Classification hiérarchique en distance euclidienne de la méthylation globale

Liste des Tableaux

Partie A : Introduction

Chapitre 1 : DOHaD

Tableau A.1 : Définition clinique du syndrome métabolique

Tableau A.2 : Seuils recommandés de tour de taille dans le diagnostic clinique de l'obésité

 abdominale

Chapitre 2 : Pollution atmosphérique

Tableau A.3 : Concentrations atmosphériques moyennes annuelles en PM_{10} et dioxyded'azote en 2005

Tableau A.4 : Récapitulatif des valeurs limites, des seuils et des objectifs de qualité pourdifférents polluants atmosphérique en Europe

Chapitre 3 : Le placenta

Tableau A.5 : Chronologie comparée de la gestation

Tableau A.6 : Classifications des différentes placentations

Tableau A.7 : Systèmes de transport des acides aminés dans le placenta humain

Tableau A.8 : Transfert placentaire des acides aminés essentiels

<u>Chapitre 4 : Effets d'une exposition gestationnelle aux gaz d'échappement de moteur</u> <u>diesel ou à des nanoparticules manufacturées</u>

Tableau A.9 : Etudes épidémiologiques – Effets sur la croissance fœto-placentaire

Tableau A.10 : Etudes épidémiologiques – Effets sur la descendance

Tableau A.11 : Modèles animaux – Effets sur la croissance fœto-placentaire

Tableau A.12 : Modèles animaux – Effets sur la descendance de la naissance à la puberté

Tableau A.13 : Modèles animaux – Effets sur la descendance à l'âge adulte

Tableau A.14 : Modèles animaux – Effets d'une exposition continue sur 3 générations

Partie C : Résultats de l'étude

Tableau C.1 : Concentrations totales en acides gras (AG) dans les plasmas F0, les placentas et les plasmas F1 à 28 jpc

Tableau C.2 : Profil en acides gras (AG) du plasma des femelles adultes Fo T et E à 28 jours de gestation (% des acides gras totaux)

Tableau C.3 : Profil en acides gras PL des placentas F1 T et E à 28 jours de gestation (% des acides gras totaux)

Tableau C.4 : Profil en acides gras LN des placentas F1 T et E à 28 jours de gestation (% des acides gras totaux)

Tableau C.5 : Profil en acides gras du plasma des fœtus F1 T et E à 28 jours de gestation (% des acides gras totaux)

Tableau C.6 : Analyse d'enrichissement (GSEA) – Base de données C2:KEGG

Tableau C.7 : Analyse d'enrichissement (GSEA) – Base de données C5:BP

Tableau C.8 : Analyse d'enrichissement (GSEA) – Base de données C5:MF

Partie D : Bilan, discussion et perspectives

 Tableau D.1 : Effectifs des volets EPAPP embryons et glandes mammaires

Tableau D.2 : Effectifs du volet EPAPP pour le suivi physiologique des individus F1

Liste des encarts

Partie A : Introduction

Chapitre 1 : DOHaD

Encart A.1 : Contexte historique et social de deux cohortes humaines permettant l'étude des effets des perturbations nutritionnelles en cours de grossesse sur la santé des descendants à long terme

Chapitre 2 : Pollution atmosphérique

Encart A.2: Marqueurs de l'exposition à la pollution atmosphérique utilisés dans les études épidémiologiques

Chapitre 4 : Effets d'une exposition gestationnelle aux gaz d'échappement de moteur diesel ou à des nanoparticules manufacturées

Encart A.3 : Techniques d'exposition utilisées dans les modèles animaux

Partie B : Modèle expérimental et analyses

Encart B.1 : Principales caractéristiques du modèle lapin

ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AGMI	Acides gras monoinsaturés
AGNE	Acides Gras Non Estérifiés
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AGS	Acides gras saturés
ALAT	Alanine aminotransférase
АМН	Anti-Mullerian Hormone
ANG-2	Angiopoïétine 2
ANG-1	Angiopoïétine 1
ARN	Acide RiboNucléique
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
ATPase	ATP synthétase
С	Contrôle
C5:BP	Base de données GO "Biological Process"
C5:CC	Base de données GO "Cellular Component"
C5:MF	Base de données GO "Molecular Function"
CAH	Composés Aromatiques Hétérocycliques
CCL2/MCP-1	C-C motif chemokine ligand 2/Macrophage cationic peptide 1
CD11b	Integrin α M
CDKN1B	cyclin dependent kinase inhibitor 1B
CDKN2AIP	cyclin dependent kinase inhibitor 2A interacting protein
CDKN2D	cyclin dependent kinase inhibitor 2D
CO	Monoxyde de Carbone
CO ₂	Dioxyde de Carbone
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1 ou Fractalkine
CX3CR1	Chemokine C-X3-C motif receptor 1
DE	Diesel Exhaust ou Gaz d'échappement de moteur diesel
DHA	Acide Docosahéxanoique
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
DNMTs	DNA MethylTransferase
DOHaD	Developemental of Health and Disease
E	Exposé
E2	Oestradiol
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FABPm	Fatty Acid Binding Protein plasma membrane
FAT/CD36	
	Fatty Acid Translocase
FATP	Fatty Acid Translocase Fatty Acid Transport Protein
FATP FGF-2	Fatty Acid Translocase Fatty Acid Transport Protein Fibroblast Growth Factor 2
FATP FGF-2 FI	Fatty Acid Translocase Fatty Acid Transport Protein Fibroblast Growth Factor 2 Flow Index
FATP FGF-2 FI FSH	Fatty Acid Translocase Fatty Acid Transport Protein Fibroblast Growth Factor 2 Flow Index Follicle Stimulating Hormone
FATP FGF-2 FI FSH GAP-43	Fatty Acid Translocase Fatty Acid Transport Protein Fibroblast Growth Factor 2 Flow Index Follicle Stimulating Hormone Growth Associated Protein-43

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GO	Gene Ontology
Н3К4	Histone 3 Lysine 4
Н3К9	Histone 3 Lysine 9
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
hCG	human Chorionic Gonadotropin
HCO ₃	Hydrogénocarbonate
HDAC1	Histone Desacetylase 1
HDL	High Density Lipoprotein
HEPHL1	Hephaestin Like 1
H-FABP	Heart - Fatty Acid Binding Protein
HFD	High Fat Diet
HNF4a	Hepatocyte Nuclear Factor 4a
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IGF1-R	Insulin-like Growth Factor 1-Receptor
IGF-2	Insulin-like Growth Factor 2
Igf2P0	Transcrit placentaire de Insulin-like Growth Factor 2
IGF2-R	Insulin-like Growth Factor 2-Receptor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor - Binding Protein
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
IREG1	Iron-Regulated Protein 1 ou Ferroportine
IRM	Imagerie par Résonnance Magnétique
jpc	jours post-conception
jpn	jours post-nataux
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Kim-1	hepatitis A virus cellular receptor 1
КО	Knock-Out
LAT1	Large neutral Amino acid Transporter 1
LAT2	Large neutral Amino acid Transporter 2
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	Low Density Lipoprotein - Receptor
L-FABP	Liver - Fatty Acid Binding Protein
LFD	Low Fat Diet
LH	Luteinizing hormone
LN	Lipides neutres
LPL	Lipoprotein Lipase
MAPCEL	Mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory
MAPkinase	Mitogen-Activated Protein kinase
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NEDC	New European Driving Cycle
NO	Monoxyde d'azote
NO ₂	Dioxyde d'azote
NO _x	Oxydes d'azote
NR2A	N-methyl-Aspartate receptor
0	Oxygène
-------------------	--
O ₂	Dioxygène
O ₃	Ozone troposphérique
OKL38	oxidative stress induced growth inhibitor 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	Odds Ratio
P4	Progestérone
PAG	Petit poids pour l'Age Gestationnel
Pdx1	pancreatic and duodenal homeobox 1
p-FABPpm	placental plasma membrane Fatty Acid Binding Protein
PGC-1a	Peroxisome proliferator-activated receptory coactivator 1 $\!\alpha$
PL	Phospholipides
PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)
PIGF	Placental Growth Factor
PM ₁₀	Particulate Matter 10
PM _{2.5}	Particule Matter 2,5
PPN	Petit Poids de Naissance
PVP	Polyvinylpyrrolidine
RCIU	Retard de Croissance Intra-Utérin
RIVM	National Institute for Public Health and th Environment
	Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain
RT-qPCR	Reaction
SA	Semaine d'Aménorrhées
Sin3A	SIN3 Transcription Regulator Family Member A
SL38	Solute Carrier family 38 (code pour SNAT)
SLC2	Solute Carrier family 2 (code pour GLUT)
SO ₂	Dioxyde de Soufre
TF	Transferrine
TFRC	Récepteur à la Transferrine
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
UCEA	Unité commune d'expérimentation animale
UCP2	Uncoupled Protein 2
USEPA	United States Environmental Protection Agency
USF-1	Upstream Stimulatory Factor 1
VD	Vélocité diastolique
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VEGFa	Vascular Endothelial Growth Factor α
VFI	Vascularization Flow Index
VI	Vascularization Index
VS	Vélocité systolique
Zac1	PLAG1 like zinc finger 1

Partie A

Introduction

Introduction générale

Le concept d'origines développementales de la santé et des maladies ou DOHaD (*Developemental Origins of Health and Disease*) stipule que l'environnement intra-utérin et péri-conceptionel conditionne la susceptibilité à développer un ensemble de pathologies à l'âge adulte. En effet, l'altération des conditions dans lesquelles le fœtus se développe programme les tissus afin d'assurer la survie à court terme. Néanmoins, ces adaptations, généralement liées au placenta, causent des perturbations durables des structures et des fonctions tissulaires susceptibles de favoriser le développement de pathologies à l'âge adulte.

La pollution atmosphérique est un problème majeur pour la santé humaine, causant 3,7 millions de décès prématurés dans le monde en 2012 ((UNEP) 2014). La plupart des villes des pays développés et en développement, où les taux de pollution sont mesurés, ne respectent pas les directives préconisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ((UNEP) 2014). Les personnes âgées, les enfants ou les asthmatiques sont les cibles des messages d'alerte lors de pics de pollution alors que les femmes enceintes sont le plus souvent négligées.

Pour des raisons éthiques indiscutables, le recours aux modèles animaux est nécessaire afin de vérifier les résultats obtenus grâce aux études épidémiologiques et d'analyser les mécanismes sous-jacents aux effets observés. Il s'agit essentiellement de modèles rongeurs et il est important de noter que la comparaison entre toutes les études est complexe au vu des techniques d'exposition utilisées ainsi que des temps et des fenêtres d'exposition ou encore du type et de la concentration des particules utilisées.

Dans cette thèse, une première partie introductive décrit d'abord la thématique des origines développementales de la santé et des maladies (**Partie A, §1.**). Dans une deuxième partie, les composants de la pollution atmosphérique sont présentés et plus particulièrement la production et la composition des gaz d'échappement de moteur diesel (**Partie A, §2.**). La troisième partie de l'introduction décrit le placenta, qui est à l'interface entre la mère et le fœtus et joue le rôle de senseur de l'environnement maternel (**Partie A, §3.**). Ensuite, la quatrième partie fait état des effets d'une exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel et aux nanoparticules manufacturées sur le développement fœto-placentaire, l'enfance et jusqu'à l'âge adulte

(**Partie A, §4.**). La cinquième et dernière partie de l'introduction expose les différents facteurs qui peuvent intervenir dans le transfert transplacentaire des particules (**Partie A, §5.**). Les objectifs de la thèse clôturent cette introduction (**Partie A, §6.**).

Les matériels et méthodes présentent le choix du modèle animal, le protocole expérimental et les différentes techniques utilisées au cours de ces travaux (**Partie B**).

Ensuite, les résultats obtenus au cours de cette thèse sont présentés sous forme d'un article original publié (**Partie C, §1.**), de résultats complémentaires associés à cette publication (**Partie C, §2.**) et enfin un article en préparation (**Partie C, §3.**).

Enfin, les dernières parties de ce manuscrit font un bilan des résultats du projet dans lequel s'inscrit cette thèse (**Partie D, §1.**), certaines questions, forces et limites y sont soulevées et discutées (**Partie D, §2. et 3.**) et plusieurs perspectives sont présentées (**Partie D, §4.**). Une courte conclusion clôture ce manuscrit (**Partie E**).

Les dernières pages sont consacrées aux annexes et aux références citées tout au long de ce manuscrit.

Famine hollandaise : La famine hollandaise a eu lieu dans l'ouest des Pays-Bas au cours de l'hiver 1944 - 1945, suite à l'embargo sur l'approvisionnement en denrées alimentaires imposé par l'occupation allemande. L'apport calorique moyen par habitant adulte était de 400 calories/jour, représentant moins d'un quart des besoins quotidiens d'une femme adulte (2000 calories/jour en activité normale et jusqu'à 2500 calories/jour en cours de grossesse). La cohorte de naissances de la famine hollandaise rassemble les enfants nés des femmes exposées aux 13 semaines de carence calorique pendant leur grossesse (au premier, second ou troisième trimestre). La cohorte se compose de 2414 hommes et femmes nés à terme entre le 01/11/1943 et le 28/02/1947 dans un hôpital d'Amsterdam, tous les enfants nés entre le 07/01/1945 et le 08/12/1945 ayant été exposés à la famine avant leur naissance. (Roseboom *et al.* 2001)(Painter *et al.* 2005)(Portrait *et al.* 2011)

Grande famine en Chine : La Grande famine en Chine, conséquence de la politique du « Grand Bon en Avant » visant à amplifier l'industrialisation, a duré 3 ans (été 1958 - été 1961). Elle a causé 30 à 60 millions de décès, particulièrement concentrés dans les zones rurales. Les taux de mortalité les plus élevés ont été observés en 1959 et 1961. La cohorte se compose de 7874 hommes et femmes. Pour la formation de cette cohorte, le pays a été divisé en 6 régions, puis 22 comtés par région ont été sélectionnés au hasard, ensuite 3 municipalités par comté, puis 2 villages par municipalité, puis 90 ménages par village (examen physique), enfin 30 ménages au sein de ces 90 ont été sélectionnés pour l'enquête alimentaire et les prélèvements sanguins. Au sein de cette cohorte, les personnes sont sélectionnées sur leur date de naissance entre le 01/10/1952 et le 30/09/1964. Les dates exactes du début et de la fin de la famine n'étant pas connues, les périodes du 01/10/1958 au 30/09/1959 et du 01/10/1961 au 30/09/1962 ont été exclues. Trois périodes sont sélectionnées pour définir les groupes de personnes non exposées (naissance entre le 01/10/1962 et 30/09/1964), les personnes exposées in utero (naissance entre le 01/10/1959 et le 30/09/1961) et enfin les personnes exposées pendant l'enfance (naissance entre le 01/10/1952 et le 30/09/1958) (Lietal. 2010).

Encart A.1 | Contexte historique et social de deux cohortes humaines permettant l'étude des effets des perturbations nutritionnelles en cours de grossesse sur la santé des descendants à long terme

Partie A : Introduction

1. Origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte ou Developmental Origins of Health and Disease

1.1. Concept d'origines développementales de la santé

1.1.1. Historique

L'hypothèse des origines fœtales de la santé et des maladies de l'adulte a été proposée par Barker en 1986, sous le terme encore souvent utilisé de « programmation fœtale » ou « programmation métabolique ». Les études épidémiologiques de Barker ont en effet démontré un lien entre un faible poids de naissance (inférieur à 2,5 kg) et un risque accru de cardiopathies ischémiques à l'âge adulte (Barker & Osmond 1986; Barker *et al.* 1989). Il a alors proposé l'hypothèse qu'une sous-nutrition durant la vie fœtale programme un risque accru de maladies cardiovasculaires et métaboliques à l'âge adulte. Cette hypothèse a d'abord été vivement contestée car le lien direct entre un faible poids de naissance et une sous-nutrition fœtale ou maternelle n'avait pas été fait. De plus, d'autres chercheurs avaient mis en évidence que la période de croissance la plus sensible aux perturbations environnementales était la période post-natale précoce et non la période intra-utérine (Singhal & Lucas 2004). Cependant, d'autres études ont confirmé qu'un faible poids de la naissance à l'âge d'un an est associé à un nombre plus élevé de décès causés par des pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte (Kermack *et al.* 1934; Osmond *et al.* 1993).

Quinze ans plus tard, une série d'études épidémiologiques ont démontré le lien de causalité entre nutrition maternelle pendant la grossesse et santé des descendants à long terme, confortant les premières observations de Barker et permettant le développement du concept de *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) ou programmation développementale. La plus connue de ces études est celle des enfants nés de mères exposées à la famine hollandaise durant la Seconde Guerre Mondiale (**Encart A.1**)(Roseboom *et al.* 2001; Painter *et al.* 2005; Portrait *et al.* 2011). Cette étude a confirmé les observations initiales d'association entre les environnements pré- et post-natal et le risque de développement de maladies cardiovasculaires mais a aussi apporté des informations sur la programmation de l'hypertension, de l'intolérance au glucose, du diabète de type 2 (indépendant de l'insuline), de la résistance à l'insuline et de l'obésité*



Figure A.1 | Origines développementales de la santé et des maladies de l'adulte

Les signaux délétères de l'environnement maternel, transmis par le placenta, causent des adaptations métaboliques et physiologiques du fœtus favorisant sa survie à court terme. Les adaptations ont des conséquences à long terme puisqu'elles conduisent à un phénotype adulte plus ou moins susceptible de développer des pathologies métaboliques.

(Roseboom *et al.* 2001; Painter *et al.* 2005; Portrait *et al.* 2011). Ces symptômes sont les composants du syndrome métabolique (Federation 2006; Alberti *et al.* 2009).

1.1.2. Phénotype « économe » et Réponse Adaptative Prédictive

Durant les vingt dernières années, plusieurs mécanismes ont été proposés comme fondement biologique de l'association entre le poids de naissance et les pathologies développées chez l'adulte. En 1992, Hales et Barker ont proposé que le phénotype des adultes, ayant subi une sous-nutrition in utero, résulte de la mise en place chez le fœtus d'un phénotype « économe » ou « thrifty phenotype » qui persiste chez l'adulte (Hales & Barker 1992). Ce phénotype serait une réponse adaptative à un environnement in utero pauvre en nutriments, se traduisant par l'optimisation de la croissance de certains organes vitaux (comme le cerveau) au détriment d'autres, afin de favoriser la survie immédiate du fœtus. Il favoriserait aussi l'adaptation post-natale à un environnement nutritionnel similaire à celui rencontré in utero. Cette notion d'adaptation fœtale pour donner un avantage métabolique à l'individu en prévision d'un environnement post-natal carencé est appelée « réponse adaptative prédictive » ou « predictive adaptive response » (Gluckman & Hanson 2004). Il a donc été proposé que cette adaptation devienne préjudiciable seulement en cas d'environnement nutritionnel post-natal différent de l'environnement nutritionnel anté-natal (Hales & Barker 1992, 2001). Ce concept est conforme à la définition de la programmation donnée par Lucas en 1998 (Lucas 1998). Selon lui, la programmation implique l'action d'un stimulus programmateur à une période « sensible » produisant des effets à long terme 1) en induisant, supprimant ou altérant le développement d'une structure somatique permanente ou 2) en déréglant un système physiologique (Lucas 1998). En 1976, McCance a été l'un des premiers à utiliser le terme de « périodes critiques » s'étendant des stades de développement précoce à l'âge adulte, en passant par la puberté. Ces périodes définissent la trajectoire de croissance d'un individu (McCance 1976).

Les origines développementales de la santé et des maladies englobent les interactions entre la génétique individuelle et l'environnement *in utero* entrainant des changements métaboliques permanents et induisant des risques accrus de développer une pathologie chronique à l'âge adulte (**Figure A.1**). Durant la grossesse, le placenta

Critère	Mesure				
Tour de taille élevé	Définition spécifique aux populations (cf. Tableau 2)				
+ 2 des critères suivants :					
Concentration plasmatique en triglycérides élevée	≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) ou traitement spécifique de ce trouble lipidique				
Concentration plasmatique en cholestérol-HDL faible	< 40 mg/dL (1,0 mmol/L) chez les hommes < 50 mg/dL (1,3 mmol/L) chez les femmes ou traitement spécifique de ce trouble lipidique				
Pression artérielle élevée	Systolique ≥ 130 mmHg et/ou Diastolique ≥ 85 mmHg ou traitement pour une hypertension diagnostiquée antérieurement				
Glycémie à jeun élevée	≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/L ou Ou diagnostic antérieur de diabète de type 2				
Tableau A.1 Définition clinique du syndrome métabolique					

HDL : High-Density Lipoprotein

(D'après (Alberti *et al.* 2009)(Federation 2006))

Population	Seuil recommandé de tour de taille	
	Homme	Femme
Europe et Afrique du Nord	≥ 94 cm	≥ 80 cm
Asie	≥ 90 cm	≥ 80 cm
Etats-Unis/Canada	≥ 102 cm	≥ 88 cm

Tableau A.2 | Seuils recommandés de tour de taille dans le diagnostic clinique de l'obésité abdominale

Au-delà de ces seuils, les patients sont diagnostiqués obèses et présentent un risque accru de développer des pathologies métaboliques. (Différentes sources: WHO, IDF, AHA/NHLBI). (D'après (Alberti*etal.* 2009))

participe à la mise en place de ces adaptations (voir § 1.3), nous pouvons ainsi le définir comme un agent programmateur de la santé post-natale (voir § 1.3.5).

1.2. Programmation développementale du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est défini par l'association d'une obésité centrale (c'està-dire une augmentation du périmètre abdominal) et au moins deux des quatre critères suivants : concentration plasmatique en triglycérides élevée, diminution du taux de cholestérol-HDL (*High-Density Lipoprotein*), hypertension et glycémie à jeun élevée (**Tableau A.1**)(Federation 2006; Alberti *et al.* 2009). La valeur seuil recommandée pour le tour de taille, pour le diagnostic de l'obésité abdominale, varie en fonction des pays et entre les hommes et les femmes (**Tableau A.2**) (Federation 2006; Alberti *et al.* 2009).

Chacun de ces paramètres développés à l'âge adulte est en partie programmé par l'environnement *in utero* et par l'environnement au cours des premières années après la naissance.

1.2.1. Programmation développementale de l'obésité

L'Indice de Masse Corporelle (IMC), utilisé pour estimer la corpulence d'une personne, est le rapport entre sa masse (en kg) et sa taille (en m) au carré. Chez l'Homme adulte, le surpoids est défini par un IMC supérieur à 25kg/m² et l'obésité par un IMC supérieur à 30kg/m². Entre les années 1980 et 2000, la prévalence mondiale de l'obésité a doublé chez les adultes d'une prévalence de 15% en 1980, à 23,3% en 1994 pour atteindre 30,9% en 2000. (Campfield *et al.* 1998; Flegal *et al.* 2002; Ogden *et al.* 2007). Depuis 2000, l'augmentation du nombre d'adultes obèses se poursuit puisqu'ils représentaient 36% de la population aux Etats-Unis. En revanche, chez les enfants/adolescents, la prévalence de l'obésité stagne à 17% depuis 2003-2004 (obésité définie dans cette étude par un IMC supérieur ou égal au 95^{ème} percentile de l'IMC à cet âge sur les diagrammes de croissance)(Ogden *et al.* 2002; Ogden *et al.* 2012; Ogden *et al.* 2015). Cette augmentation de la prévalence de l'obésité est associée à une augmentation d'autres pathologies incluant le diabète de type 2, une pression artérielle élevée et des pathologies cardiovasculaires (Ogden *et al.* 2007). En France, l'enquête ObEpi, mise à jour régulièrement, a mis en évidence une augmentation de la prévalence de l'obésité depuis

les années 1990, puisque 13% de la population était obèse en 2006 et 15% en 2012 (INSERM *et al.* 2012).

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré l'association entre le poids de naissance et l'IMC à l'âge adulte chez l'humain (Sorensen et al. 1997; Parsons et al. 2001; Yajnik 2003). Il existe une corrélation entre la nutrition prénatale et la trajectoire de croissance post-natale en lien avec l'adiposité chez l'adulte. En effet, une étude épidémiologique anglaise a mis en évidence une corrélation faible, mais positive, entre le poids de naissance et l'IMC à l'âge de 33 ans. Cette corrélation est associée à l'observation d'une relation entre un IMC maternel élevé et l'augmentation du poids de naissance de l'enfant associée à une augmentation de l'IMC de l'individu à l'âge adulte (Parsons et al. 2001). Un apport nutritif important pendant le développement fœtal est une cause de la corrélation entre un IMC maternel élevé et le poids de l'individu de la naissance à l'âge adulte. L'analyse récente d'une cohorte américaine a permis de mettre en évidence que si les femmes enceintes ont une prise de poids supérieure aux instructions données par l'« Institute of Medicine », leurs filles sont plus susceptibles d'être en surpoids à l'âge de 40 ans (Houghton et al. 2016). Grâce à la cohorte EDEN, des chercheurs français ont montré que les variations de poids de la femme avant la conception pouvaient aussi jouer un rôle dans la programmation d'une obésité chez leurs descendants à l'âge adulte. En particulier, une perte de poids de la femme, avec un IMC inférieur ou égal à 25kg/m² entre l'âge de 20 ans et la conception de son enfant, est associée à une augmentation du risque de petit poids pour l'âge gestationnel* (PAG) de cet enfant (Regnault et al. 2010; Diouf et al. 2011). En revanche, l'IMC paternel n'est pas corrélé au poids de naissance de l'enfant, alors qu'une obésité paternelle entraine une augmentation de la vitesse de croissance post-natale et du poids de l'enfant à 3 mois (Regnault *et al.* 2010).

Comparées aux personnes nées avec un poids de naissance élevé, les personnes nées avec un faible poids de naissance possèdent un IMC plus faible à l'âge adulte mais développent une obésité abdominale, une réduction significative de la masse maigre et une teneur en gras plus élevée à l'adolescence et à l'âge adulte (Law *et al.* 1992; Malina *et al.* 1996; Okosun *et al.* 2000; Singhal *et al.* 2003). De plus, les enfants nés en retard de croissance ont une vitesse de croissance post-natale élevée durant leur première année

^{*}Petit poids pour l'âge gestationnel (PAG) (SGA: « Small for Gestational Age »): le petit poids pour l'âge gestationnel est défini comme un poids isolé (estimation *in utero* ou à la naissance) inférieur au 10^{ème} percentile. Le PAG devient sévère lorsqu'il est inférieur au 3^{ème} percentile.

après la naissance, cette différence n'existant plus à l'âge d'un an. A l'adolescence, les enfants nés en retard de croissance intra-utérin* (RCIU) possèdent un tour de taille et des concentrations plasmatiques en insuline plus élevées (Crume et al. 2014). Lorsque l'apport calorique maternel est réduit pendant le début de la grossesse, comme au cours de la famine hollandaise en 1944-1945, les enfants avec un poids normal à la naissance développent un surpoids et une augmentation du tour de taille à 50 ans (Ravelli et al. 1999; Roseboom et al. 2001). Cependant, il est difficile de conclure sur les effets périconceptionnels, car les pères aussi étaient soumis à une restriction alimentaire. Plusieurs études ont mis en évidence que des enfants nés avec un poids faible mais grandissant dans un environnement riche pendant l'enfance sont plus susceptibles de développer une obésité et des pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte. Ce phénotype adulte apparaît similaire à celui des personnes nées avec un poids de naissance élevé (Bavdekar et al. 1999; Parsons et al. 2001). Ces effets sont confirmés par des études menées sur les modèles animaux. Par exemple, dans un modèle de restriction calorique maternelle pendant la deuxième moitié de la gestation chez le rat, les petits nés de mères restreintes sont en retard de croissance et lorsqu'ils grandissent dans un environnement nutritionnel riche pendant les premières semaines après la naissance, ils développent une obésité à l'âge adulte (Desai et al. 2005).

Il est important de souligner que le retard de croissance à l'origine de la programmation peut avoir de nombreuses étiologies, parmi lesquelles une perturbation de la fonction placentaire. L'exposition à la fumée de cigarette pendant le développement fœtal entraine aussi des perturbations de la fonction placentaire conduisant à une augmentation du risque d'obésité chez l'individu adulte. La gravité de l'obésité est associée à l'intensité de l'exposition aux fumées de cigarette. (Wideroe *et al.* 2003).

1.2.2. Programmation développementale des pathologies cardiovasculaires et de l'hypertension

En 1987, Barker et ses collaborateurs ont mis en évidence la relation entre un faible poids à la naissance et à l'âge d'un an et un risque plus élevé de décès causés par des pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte (Barker *et al.* 1989; Osmond *et al.* 1993). Dans

une cohorte finlandaise, il a été démontré que non seulement un faible poids de naissance était corrélé à un risque accru de développer des pathologies métaboliques à l'âge adulte, mais aussi qu'un gain de poids important pendant les premières années après la naissance et pendant l'adolescence amplifiait ce phénomène (Eriksson *et al.* 1999; Eriksson *et al.* 2001). Par conséquent, les personnes ayant le profil le plus à risque de développer des pathologies cardiovasculaires seraient les hommes ou femmes nés avec un faible poids de naissance et obèses à l'âge adulte (Eriksson & Forsen 2002).

Parmi les symptômes des maladies cardiovasculaires, l'hypertension est négativement corrélée au poids de naissance, cette corrélation s'amplifiant avec l'âge (Law & Shiell 1996). Huxley et ses collaborateurs ont mis en évidence que le poids et le périmètre de la tête de l'enfant à la naissance sont corrélés négativement à la pression systolique à la naissance. Une croissance post-natale accélérée est aussi associée à une augmentation de la pression artérielle surtout en période post-natale précoce et à l'âge adulte, cette corrélation étant atténuée à l'adolescence (Huxley *et al.* 2000). Chez les rongeurs (rat et souris), un régime maternel hypoprotéique au cours de la gestation entraine un RCIU associé à une hypertension chez la descendance à l'âge adulte (Langley-Evans *et al.* 1996; Manning & Vehaskari 2001; Vehaskari *et al.* 2001; Woods *et al.* 2001; Goyal & Longo 2013). Cependant, les effets observés sur la descendance sont étroitement dépendants du type de régime alimentaire, de la fenêtre d'exposition au régime et peuvent varier en fonction du sexe de l'individu (Langley-Evans 2000; Goyal & Longo 2013).

1.2.3. Programmation développementale de l'insulino-résistance et du diabète de type 2

Des études épidémiologiques de la famine hollandaise ou chinoise (Li *et al.* 2010b; Portrait *et al.* 2011) ont montré qu'une exposition *in utero* à une sous-nutrition maternelle entraine une augmentation des risques de pathologies métaboliques chez les descendants une fois adultes, incluant le diabète de type 2 (**Encart A.1**).

Chez le rat, un régime maternel hypoprotéique pendant la gestation et la lactation peut causer une altération de l'expression hypothalamique de réseaux de gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'insuline et dans le métabolisme des lipides et du glucose chez les descendants, pouvant programmer des pathologies d'ordre



Figure A.2 | ADN et marques épigénétiques

H1 : Histone H1 (histone de liaison entre les nucléosomes).

Ce schéma représente les différents niveaux de compaction de l'ADN, allant de la double hélice d'ADN à la chromatine condensée sous forme de chromosome, en passant par la formation des nucléosomes.

Les étoiles orange représentent les modifications épigénétiques des histones (*e.g.*, méthylation, acétylation, phosphorylation) et les étoiles violettes représentent la méthylation de l'ADN (sur les cytosines des îlots CpG).

métaboliques (Orozco-Solis *et al.* 2010). Les mécanismes impliqués sont encore peu connus, mais les effets d'un régime hypoprotéique sur les cellules β pancréatiques ont été étudiés. Cette exposition *in utero* entraine une augmentation du stress oxydatif et de la fibrose dans les cellules pancréatiques des animaux à l'âge adulte (Tarry-Adkins *et al.* 2010), une augmentation de la méthylation du promoteur du gène *HNF4a* (*Hepatocyte Nuclear Factor 4a*, impliqué dans la différenciation des cellules β pancréatiques et l'homéostasie glucidique) entrainant une diminution de son expression (Sandovici *et al.* 2011), des défauts de synthèse des mitochondries et de fonctions mitochondriales (Theys *et al.* 2011) et une augmentation de la différenciation cellulaire au lieu de la prolifération dans les îlots pancréatiques chez le rat (Rodriguez-Trejo *et al.* 2012). Toutes ces perturbations pourraient entrainer un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques et par conséquent augmenter le risque de développer un diabète de type 2.

Le concept de programmation métabolique est centré sur l'idée que l'état nutritionnel et hormonal pendant le développement détermine le contrôle à long terme de l'équilibre énergétique en programmant le comportement alimentaire futur et les dépenses énergétiques. Des rats ayant subi une restriction protéique *in utero* et post-natale ont des concentrations plasmatiques d'insuline plus faible au moment du sevrage accompagnée d'une altération du comportement alimentaire post-natal, ici une hyperphagie, que des individus ayant subi la même restriction *in utero* mais un régime normal en période post-natal (Coupe *et al.* 2009). Ces altérations peuvent être atténuées grâce à un traitement à la leptine permettant une meilleure croissance de rattrapage post-natale chez le rat et le porc (Vickers *et al.* 2005; Attig *et al.* 2013).

1.3. Programmation développementale et épigénétique

L'épigénétique est un des mécanismes proposés pour expliquer la programmation développementale des maladies de l'adulte et ses effets intergénérationnels (voir **A§1.4**). L'épigénétique est l'ensemble des modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant d'aucun changement des séquences nucléotidiques de l'ADN. Ces modifications incluent la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, les ARNs non-codants, la structure locale de l'ADN (position des nucléosomes), sa structure à plus grande échelle (organisation en domaines), sa position nucléaire et sa période de réplication pendant la phase S (**Figure A.2**) (Beaujean

et al. 2005; Godfrey *et al.* 2007; Torano *et al.* 2016). Les marques épigénétiques peuvent être transitoires ou pérennes (Godfrey *et al.* 2007; Torano *et al.* 2016). La méthylation de l'ADN, très stable, est un marqueur privilégié de l'environnement *in utero* (voir **A§1.3.2**) (Godfrey *et al.* 2007; Torano *et al.* 2016).

1.3.1. Marques épigénétiques

Les marques épigénétiques sont présentes à plusieurs niveaux. La méthylation des résidus 5' des cytosines des îlots CpG (régions de l'ADN riches en cytosine/guanine) est réalisée par les DNA-méthyltransférases (DNMTs) (Bird 2002). DNMT1, la plus abondante de ces enzymes, joue un rôle majeur dans le maintien de la méthylation de l'ADN grâce à son affinité plus élevée pour les îlots CpG hémiméthylés (possédant déjà un groupe méthyl) que pour les îlots CpG totalement déméthylés (Bird 2002). DNMT3a et DNMT3b permettent la méthylation *de novo* des îlots CpG (Bird 2002). L'hyperméthylation des régions promotrices de l'ADN est associée à une répression transcriptionnelle (Lillycrop 2011; Lillycrop & Burdge 2011).

Les modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitinylation et SUMOylation de leur chaîne N-terminale) constituent un autre type de marques épigénétiques (Lee 2015). Les histones sont des protéines basiques qui facilitent la compaction de l'ADN dans le noyau et la régulation de l'expression des gènes dans la cellule (Lee 2015). Les histones participent au premier stade de compaction de l'ADN, l'enroulement de la double hélice d'ADN en nucléosomes (**Figure A.2**). Les nucléosomes sont composés de 147 paires de bases d'ADN enroulés autour d'un octamère d'histones, appelées H2A, H2B, H3 et H4 (Lee 2015).

De plus, le génome humain contenant seulement 20 000 gènes codants (moins de 2% du génome total), une fraction considérable est transcrite en nombreux ARNs courts non-codants à la capacité limitée à coder des protéines (Lee 2015). Les ARNs non-codants les plus étudiés sont les micro-ARNs, de 20 à 22 nucléotides, très bien conservés et localisés, pour la majorité, dans les introns et les exons des gènes codants (70%) ou dans les régions intergéniques (30%) (Lee 2015). Leur rôle dans la programmation développementale reste très peu étudié.



Figure A.3 | Effets intergénérationnels

Les effets intergénérationnels de l'exposition de la génération F0 à un environnement gestationnel perturbé sont observés à la génération F2. La perturbation (F0) affecte directement le développement *in utero* de la génération F1 et plus particulièrement le développement des cellules germinales à l'origine de la génération F2.

Les rectangles bleus représentent la voie paternelle et les rectangles roses représentent la voie maternelle. Les rectangles pleins illustrent le vecteur à l'origine directe du phénotype de chaque génération.

1.3.2. Exemple représentatif

Chez le rat en RCIU (induit par ligature de l'artère utérine en fin de gestation), l'expression du gène *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*), facteur de transcription indispensable au développement pancréatique, est réduite dans les cellules β pancréatiques à l'âge de 2 semaines. Cette répression transcriptionnelle est liée à une désacétylation des histones H3 et H4 par l'enzyme HDAC1 (*histone desacetylase 1*) associée au co-répresseur Sin3A et à une perte de liaison du facteur de transcription USF-1 (*Upstream Stimulatory Factor 1*) dans la zone promotrice du gène *Pdx1*. Ces modifications accompagnent le développement d'un diabète de type 2 associé à la méthylation des îlots CpG du promoteur du gène *Pdx1* chez les rats devenus adultes (Park *et al.* 2008).

Chez le rat en RCIU (induit par restriction de la nutrition maternelle), une surnutrition dans la période postnatale précoce programme une insulino-résistance à l'âge de 8 semaines via l'hyperméthylation de sites CpGs spécifiques du gène PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha) alors sous-exprimé dans le foie et le muscle (Xie et al. 2015).

1.4. Effets intergénérationnels

1.4.1. Mécanismes impliqués

Les perturbations de l'environnement maternel (génération Fo) pendant la grossesse influencent directement le développement *in utero* de la première génération (F1). Les cellules germinales (les futurs gamètes) qui formeront la deuxième génération (F2) se développent au cours de la croissance intra-utérine. Elles sont directement exposées aux perturbations environnementales de la génération Fo (Aiken & Ozanne 2014). Leurs effets sur la génération F2 sont dits intergénérationnels, car les effets transmis *via* la lignée somatique ne peuvent être différenciés de ceux transmis *via* la lignée germinale. A partir de la troisième génération (F3), qui n'a pas été directement exposée aux perturbations environnementales de la génération F0, les effets sont définis comme transgénérationnels car transmis *via* la lignée germinale (Aiken & Ozanne 2014).

Les mécanismes responsables des effets intergénérationnels sur la génération F2 sont encore peu connus. Plusieurs hypothèses ont été proposées (**Figure A.3**):

Transmission via une altération de l'épigénome (cellules somatiques ou germinales) de la génération F1 (Ozanne & Constancia 2007),

- Transmission via les composants du cytoplasme ovocytaire (en particulier les mitochondries) de la génération F1 (Knudsen & Green 2004),
- Transmission via le développement d'un environnement utérin pauvre de la génération F1 (Aiken & Ozanne 2014).

1.4.2. Exemples représentatifs

Chez l'homme, l'étude des effets intergénérationnels s'avère complexe en raison de la durée séparant deux générations et du manque de bases de données suffisamment complètes pour réaliser des analyses *a posteriori*. Cependant, une étude épidémiologique a évalué l'impact de l'alimentation pendant l'enfance sur la santé de la descendance sur 3 générations dans la communauté d'Overkalix en Suède. La sous-nutrition des grand-pères pendant leur enfance entraine une augmentation du risque de mortalité chez leurs petits-enfants garçons (Bygren *et al.* 2001). Dans la cohorte de la famine hollandaise, les petits-enfants des femmes exposées à la carence calorique en cours de grossesse ont un IMC augmenté (Painter *et al.* 2008). De plus, les petits-enfants des hommes exposés à la carence calorique sont plus lourds, avec un IMC augmenté (Veenendaal *et al.* 2013). Les effets intergénérationnels sont donc transmis par les voies maternelle et paternelle.

Chez le rat, une sous-nutrition protéique ou une obésité ont été induites chez la génération Fo pendant 2 mois après le sevrage. Les femelles F1 issues des femelles F0 sous-nourries et obèses présentent une hyperglycémie pendant la gestation (Hanafi *et al.* 2016). De plus, les descendants F2 des femelles F1 exposées *in utero* à une sous-nutrition ou une obésité possèdent une hyperglycémie, des perturbations de l'insulinémie et de la tolérance au glucose. La sous-nutrition des femelles F0 entraine une surexpression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose dont un transporteur du glucose *SLC3A2* (*glucose transporter 2*), l'enzyme glucokinase et *l'UCP2* (*uncoupled protein 2*) et impliqués dans le stress oxydatif dont *8-oxo-guanine* (marqueur des dégâts sur l'ADN dus au stress oxydatif) chez les descendants F2 (Hanafi *et al.* 2016). Les descendants F2 des mâles F1 exposés *in utero* à la sous-nutrition ou l'obésité des F0 ne présentent pas de perturbations métaboliques (Hanafi *et al.* 2016).

Chez la souris, l'exposition des femelles Fo à une sous-nutrition calorique pendant la gestation de 12,5 jours post-conceptionnels (jpc) à la mise-bas entraine une réduction du poids des individus F2 descendants des mâles F1 exposés *in utero*. Les individus F2

descendants des femelles F1 exposées *in utero* sont prédisposées à l'obésité (Jimenez-Chillaron *et al.* 2009). Une intolérance au glucose est observée chez les descendants F2 des mâles et des femelles F1 exposés *in utero* (Jimenez-Chillaron *et al.* 2009). Toujours chez la souris, les mâles F0 exposés à une surnutrition néonatale développent un syndrome métabolique (obésité, résistance à l'insuline et intolérance au glucose). Les mâles F1 deviennent hyperinsulinémiques, hypertriglycéridémiques, insulino-résistants et intolérants au glucose, sans obésité à l'âge de 4 mois (Pentinat *et al.* 2010). Les mâles F2 développent un phénotype moins sévère avec une hyperglycémie et une intolérance au glucose à l'âge de 4 mois (Pentinat *et al.* 2010).

En conclusion, l'environnement maternel a un effet au cours de la gestation sur le développement fœtal. Différents facteurs environnementaux, comme la nutrition maternelle, peuvent rendre l'environnement intra-utérin délétère pour le développement du fœtus. Pour sa survie à court terme, le fœtus s'adapte à cet environnement délétère au niveau métabolique, génétique et épigénétique. Ces adaptations ont des conséquences jusqu'à l'âge adulte, augmentant en particulier le risque d'apparition de pathologies cardiovasculaires et d'anomalies métaboliques. Les effets de cet environnement délétère sont observables sur plusieurs générations, passant par la voie maternelle mais aussi la voie paternelle.

2. Pollution atmosphérique

La pollution atmosphérique est un problème majeur pour la santé humaine, ayant causé 3,7 millions de décès prématurés dans le monde en 2012 ((UNEP) 2014). La plupart des villes des pays développés et en développement où les taux de pollution sont mesurés et très élevés (dépassant les $100\mu g/m^3$ en moyenne annuelle pour les *Particulate Matter* 10, PM₁₀) ne respectent pas les directives préconisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, $50\mu g/m^3$ recommandé pour les PM₁₀, *Particulate Matter* 10) ((UNEP) 2014; Whiting 2014; Organization 2016). Les femmes enceintes sont exposées à ce facteur environnemental délétère, bien qu'elles ne soient pas considérées comme les personnes les plus à risque en cas de pics de pollution, au contraire des personnes âgées, des enfants ou des personnes asthmatiques.

2.1. Composition et sources de la pollution atmosphérique

La principale source bibliographique de cette partie est le document publié par l'OMS « Air Quality Guidelines – Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide » (WHO 2006). Cette synthèse de l'OMS informe sur la composition et les sources de la pollution atmosphérique et sur les risques sanitaires liés à la pollution atmosphérique.

2.1.1. Composition de la pollution atmosphérique

2.1.1.1. Polluants atmosphériques

Les polluants atmosphériques peuvent être émis par les activités humaines (polluants primaires) ou formés dans l'atmosphère par réaction chimique de gaz entre eux (polluants secondaires). Les polluants primaires incluent le dioxyde de soufre (SO₂), les oxydes d'azote (NO_x), le monoxyde de carbone (CO), les composés volatiles organiques et les particules primaires charbonneuses et non-charbonneuses. Ils sont libérés dans l'atmosphère par des sources telles que les cheminées des usines ou les systèmes d'échappement des véhicules. En principe, il est possible de quantifier ces émissions afin de dresser un inventaire des émissions de sources primaires. Les polluants primaires et l'atmosphère, impliquant généralement des composants naturels comme l'oxygène et l'eau. Les principaux polluants secondaires sont l'ozone, les NO_x et les



Figure A.4 | Taille des particules atmosphériques (échelle logarithmique) Répartition par taille des principales particules composant la pollution atmosphérique. PM: Particulate Matter

D'après W. H. O. (2006).

Région	Concentration moyenne annuelle (µg/m³)		
	PM ₁₀	Dioxyde d'azote	
Afrique	40 - 150	35-65	
Asie	35 - 220	20-75	
Australie/Nouvelle-Zélande	28 – 127	11 – 28	
Etats-Unis/Canada	20-60	35-70	
Europe	20-70	18 – 57	
Amérique latine	30 - 129	30 - 82	

Tableau A.3 | Concentrations atmosphériques moyennes annuelles en PM_{10} et dioxyde d'azote en 2005

Les valeurs fournies dans ce tableau sont tirées d'une sélection de villes représentatives. D'après W. H. O. (2006).

particules secondaires. A cause de leur mode de formation, ces polluants ne peuvent être utilisés pour dresser les inventaires d'émissions. Cependant un taux de formation peut être calculé par unité de volume d'atmosphère par unité de temps. Les polluants atmosphériques sont généralement répartis selon des catégories de taille allant d'un très faible diamètre <100 nm pour la phase particulaire ultrafine, en passant par des particules de poussières grossières ayant un diamètre autour de 10 µm, jusqu'à de très grosses particules pouvant atteindre 20 µm, ce qui reste rare (**Figure A.4**). Ces particules ont des compositions chimiques et des tailles très différentes, dépendant de leurs sources d'émissions.

2.1.1.2. Fraction particulaire

Les particules sont classées selon des catégories de taille. Les particules PM₁₀ (Particulate Matter 10) sont les particules possédant un diamètre inférieur à 10 µm, les PM_{2,5} (Particulate Matter 2,5) sont celles avec un diamètre inférieur à 2,5 µm et les particules ultrafines ou nanoparticules ont un diamètre qui n'excède pas 100 nm (Figure A.4). La catégorie PM₁₀ est la plus fréquemment utilisée comme indicateur de la concentration particulaire atmosphérique. Les concentrations annuelles moyennes varient entre 35 et 220 μ g/m³ en Asie (Administration 2002; Sivertsen 2004) et entre 30 et 129 μ g/m³ en Amérique latine (Bourotte *et al.* 2005), alors que les variations s'étendent de 15 à 60 μ g/m³ en Europe et en Amérique du Nord (Agency 2003; Matter 2004; Sivertsen & El Seoud 2004; Agency 2006) (Tableau A.3). Les particules de la catégorie PM_{2,5} sont de bons indicateurs des risques pour la santé causés par la pollution atmosphérique (WHO 2006). En raison de leur faible diamètre, ces particules pénètrent profondément dans les poumons et atteignent la circulation sanguine (Wichmann 2007). Leurs concentrations atmosphériques dépendent du type de source, de la distance de la source et de la vitesse du vent. En Europe, la concentration annuelle en PM_{2,5} sur des sites proches du trafic routier varient de 20 à 30 μ g/m³, alors qu'en zones rurales la moyenne varie de 11 à 13 $\mu g/m^3$ (Matter 2004). Aux Etats-Unis, en 2002, la concentration moyenne en PM_{2,5} calculée à partir des concentrations de 125 villes de 75 000 à 9 millions d'habitants était de 12,5 µg/m³ (Agency 2003). Les particules ultrafines ou nanoparticules, non utilisées actuellement comme indicateur des risques pour la santé ni soumises à réglementation, sont issues de la nucléation, phase initiale du processus de transformation d'un gaz en
$$NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2$$

 $NO_2 + Rayonnement solaire \rightarrow NO + O$
 $O + O_2 \rightarrow O_3$

Figure A.5 | Succession des réactions chimiques aboutissant à la libération d'ozone dans l'atmosphère.

Formation des oxydes de nitrogène et de l'oxygène troposphérique. D'après W. H. O. (2006).

NO : Oxyde d'azote; NO₂ : Dioxyde d'azote; O : Oxygène; O₂ : Dioxygène; O₃ : Ozone troposphérique.



Figure A.6 | Concentrations troposphériques en ozone et en oxydes d'azote en zones rurales et urbaines

Le trafic routier et les industries produisent des oxydes d'azote en zones urbaines. Les rayonnements solaires favorisent les réactions chimiques consommatrices d'oxydes d'azote et d'ozone troposphérique. Ce dernier étant entraîné par le vent sur des kilomètres, les concentrations troposphériques en ozone sont élevées dans les zones rurales où peu d'oxydes d'azote sont produits. NOx : Oxydes d'azote; O₃ : Ozone troposphérique. particule. Leur diamètre peut croître par un processus de condensation (lorsque des composants gazeux se condensent à la surface de la particule) ou par coagulation (lorsque deux ou plusieurs particules s'agrègent pour en former une plus grosse). Pour un même volume, les nanoparticules adsorbent une plus grande quantité de composés organiques et métalliques à leur surface que les plus grosses particules, ce qui joue un rôle sur leur toxicité. De plus, la taille des particules influe sur leur translocation à travers le placenta (voir **A§5.1**)(Muoth *et al.* 2016).

2.1.1.3. Fraction gazeuse

L'ozone troposphérique (O_3 , troposphère : couche atmosphérique la plus proche du globe, de 8 à 15 km d'altitude) est un des problèmes de pollution atmosphérique le plus répandu au niveau mondial, d'autant plus que ce gaz peut être transporté sur des milliers de kilomètres. Dans et autour des zones urbaines, les différences de concentration de l' O_3 sont importantes, avec des concentrations plus faibles dans les zones urbaines que dans les régions environnantes (WHO 2006). Ces gradients s'expliquent par les réactions chimiques entre l' O_3 et les NO_x émis dans les zones urbaines (**Figure A.5**). Dans les zones polluées comme les villes, l'acide nitrique émis par le trafic routier réagit instantanément avec l' O_3 présent et diminue ainsi les quantités d' O_3 mesurées. Les réactions chimiques sont liées au rayonnement solaire, entrainant de grandes différences de concentrations en O_3 au niveau mondial (**Figure A.6**). Les concentrations en O_3 peuvent atteindre des pics de 400 µg/m³ dans certaines villes américaines peu ventilées (Agency 2003).

Le dioxyde d'azote (NO₂) provient en majeure partie du trafic routier, mais aussi, dans une moindre mesure, de l'industrie, du trafic maritime et des habitations. Les NO_x sont des composants majeurs du « smog photochimique », une brume brunâtre épaisse causée par une réaction chimique d'un mélange de polluants atmosphériques (e.g., NO_x, composés organiques volatiles, monoxyde carbone) en présence de rayonnements solaires limitant la visibilité dans l'atmosphère. En Europe, la concentration moyenne en NO₂ dans l'air (mesure en zone urbaine, rurale ou industrielle) varie de 14 µg/m³ en Islande à 44 µg/m³ en France (Eerens *et al.* 2005). Aux Etats-Unis, la concentration moyenne annuelle en NO₂, estimée à partir de mesures réalisées dans 125 villes réparties sur tout le territoire, est de 36 µg/m³ avec 10% des villes ayant une concentration annuelle en NO₂ de

plus de 55 μ g/m³ (U.S.EPA 2003). En Inde et en Indonésie, la concentration annuelle en NO₂ s'élève à 23-74 μ g/m³, alors qu'en Australie le taux moyen annuel de NO₂ varie de 11 à 28 μ g/m³ (Department of the Environment and Heritage 2004).

Le dioxyde de soufre (SO₂) provient de la combustion des énergies fossiles. En raison de la diminution de l'utilisation du charbon, la concentration en SO₂ dans l'air a diminué depuis 2000 en Europe, Amérique du Nord et dans certaines parties de l'Asie. Au nord de la Chine, le charbon reste une source d'énergie très utilisée produisant ainsi de larges concentrations en SO₂. Entre 2000 et 2005, la concentration moyenne annuelle typique en SO₂ dans l'air dans des villes d'Asie, d'Europe, d'Afrique et d'Amérique du Nord et du Sud, avoisinait 20 μ g/m³ pour 50% d'entre elles et excédait 50 μ g/m³ pour 15% d'entre elles (WHO 2006).

2.1.2. Sources de la pollution atmosphérique

Selon la durée de vie des polluants dans l'atmosphère, la pollution atmosphérique est observée à l'échelle locale, urbaine, régionale ou globale.

La principale source de pollution atmosphérique est le trafic routier, toutes émissions confondues, sans distinction de taille des véhicules. Les émissions du trafic routier sont majoritairement les gaz d'échappement, mais aussi les évaporations de gasoil et surtout d'essence, plus volatile. En 2015, le pourcentage de véhicules particuliers dans le parc automobile français atteignait 62,4% (CCFA 2015). En 2014, la France se plaçait 5^{ème} en Europe derrière l'Irlande, le Luxembourg, le Portugal et l'Espagne pour le nombre de véhicules particuliers à moteur diesel. En 2014, seulement 4,5% des véhicules particuliers vendus aux Etats-Unis possédaient un moteur diesel, contre plus de 50% des camions (Monde). La combustion de l'essence ou du gasoil produit des gaz d'échappement contenant une large diversité de polluants, tel que le CO, des NO_x, des composants organiques volatiles et des particules en suspension. Des réglementations nationales ou internationales pour les concentrations atmosphériques de polluants émis par les véhicules ont été mises en place aux Etats-Unis (l'état de Californie applique des normes plus strictes), au sein de l'Union Européenne et au Japon. Les pays en développement suivent les normes européennes ou américaines. Ces réglementations définissent en particulier la quantité (en g) de polluant émis (CO, NO_x, composés organiques volatiles et particules) par la distance parcourue (en km) au cours d'un cycle de conduite standard

(vitesse contrôlée). Les cycles de conduite se divisent en deux catégories. Les cycles modaux (dont le NEDC, New European Driving Cycle, utilisé en Europe) sont une compilation d'accélérations linéaires et de périodes de vitesse constante. Ils sont peu représentatifs de la réalité. Les cycles transitoires comportent de nombreuses variations de vitesse et ressemblent davantage à des conditions de conduite sur route. Aux Etats-Unis, 5 cycles différents sont utilisés combinant un cycle de représentation de la conduite en ville, un cycle d'évaluation de la consommation de carburant sur autoroute et trois autres simulant une conduite plus agressive, une température extérieure élevée ou négative. Lors de ces cycles de conduite, les gaz d'échappement sont collectés et analysés. En 2015, la société allemande Volkswagen a été accusée d'avoir inséré des lignes de codes supplémentaires au calculateur des moteurs de leurs véhicules vendus entre 2009 et 2015. Le calculateur du moteur est considéré comme le « cerveau » analysant un grand de nombres de données sur un millième de seconde afin d'adapter le fonctionnement du moteur aux conditions de conduite (exemple : augmentation de la puissance du moteur lors la mise en marche de la climatisation). Ces lignes de codes supplémentaires permettaient au calculateur de reconnaître les conditions de tests lors des cycles de conduite et de réduire artificiellement l'émission de polluants atmosphériques et notamment les NO_x pour le passage du test (Monde ; Environment 2015).

La combustion d'énergies fossiles dans les centrales fixes de combustion est la deuxième source d'émissions polluantes dans la plupart des pays (News 2015; Petitjean 2016). La combustion à haute température produit des NO_x et du SO_2 , en cas de présence de soufre dans le combustible, ainsi que des composés organiques volatiles provenant surtout de la combustion partielle du charbon et du pétrole.

La troisième source d'émissions concerne les industries possédant des procédés conduisant à des émissions de polluants atmosphériques comme les NO_x, le SO₂ et les composés volatiles organiques.

Les feux de forêts et la combustion de la biomasse représentent une source non négligeable avec des émissions par combustion incluant les NO_x, le CO, les composés organiques volatiles et les particules en suspension. Ces évènements sont cependant non prévisibles et donc difficilement quantifiables dans les inventaires d'émissions polluantes,



Figure A.7 | Mécanisme de combustion du gasoil dans un moteur diesel.

La combustion du gasoil dans les moteurs diesel est un processus non homogène. Elle se divise en quatre phases :

(1) Une admission d'air : l'air pénètre dans le cylindre grâce à la descente du piston. L'oxygène est un élément indispensable de la combustion. A la fin de ce processus, la soupape se ferme et le cylindre devient étanche.

(2) Une compression : le piston remonte jusqu'à son point mort supérieur et l'air comprimé dans la chambre de combustion passe à une très haute température, avoisinant les 500°C.

(3) Une combustion : le gasoil est ensuite injecté et s'enflamme immédiatement au contact de l'air comprimé, sans qu'un allumage ne soit nécessaire, au contraire des moteurs à essence. La combustion impulse au piston un violent mouvement descendant qui constitue le temps de travail proprement dit du moteur.

(4) Une expulsion : le cycle se conclut par l'ouverture de la soupape d'échappement et la remontée du piston qui facilite l'expulsion des gaz.

(Source: (Golfy 2001))

bien qu'ils puissent être pris en compte dans certaines cohortes ayant été particulièrement affectées.

Enfin, la nature est source de différents gaz et particules, les plus connus étant les composés volatiles organiques émis par les arbres et autres végétations (isoprène, terpènes et autres composants). Ces substances contribuent à la production de polluants tels que l'O₃ (super-oxydant ayant des effets nocifs sur la vie humaine, animale et végétale, **Figure A.5**) et de particules organiques secondaires. L'élevage produit environ 9% des émissions anthropiques de CO_2 dues à l'expansion des pâturages mais aussi à l'utilisation d'énergie fossile pour le fonctionnement des engins agricoles ou encore le chauffage des bâtiments (F.A.O. 2006).

2.2. Gaz d'échappement de moteur diesel

Le moteur diesel a été breveté en 1892 par Rudolf Diesel, qui l'a conçu comme moteur principal offrant plus d'efficacité énergétique que les moteurs à essence (ou moteurs à allumage commandé). Ce type de moteur a d'abord été utilisé dans les secteurs maritimes, ferroviaires et militaires, avant d'être adapté aux véhicules privés autour des années 1980 (Steiner *et al.* 2016). L'avantage majeur du moteur diesel comparé aux moteurs à essence est sa plus grande robustesse et son meilleur rendement énergétique. Cependant, les moteurs diesel émettent plus de particules par kilomètre parcouru que les moteurs à essence. Avec l'arrivée des véhicules diesel dans le secteur du transport privé, une augmentation des émissions a donc été observée dans les centres villes, induisant inévitablement une forte exposition continue de la majeure partie de la population (Steiner *et al.* 2016).

2.2.1. Mécanisme de combustion d'un moteur diesel

Le mécanisme d'un moteur diesel est la compression de l'air à forte pression et haute température. Lorsqu'il est injecté dans l'air comprimé, le carburant diesel s'enflamme et libère son énergie chimique (**Figure A.7**). Le carburant diesel est un mélange d'un grand nombre de molécules hydrocarbonées allant de C₇ à C₃₅. La combustion complète ou incomplète du carburant des véhicules diesel forme un mélange complexe de gaz (phase gazeuse des hydrocarbonés, CO, CO₂, NO, NO₂, SO₂) et de particules (matière carbonée, sulfate et traces d'autres éléments) (voir § 2.2.2.).

La combustion du gasoil dans les moteurs diesel est un processus non homogène. Elle se divise en quatre phases (**Figure A.7**):

- Une admission d'air : l'air pénètre dans le cylindre grâce à la descente du piston. L'oxygène est un élément indispensable de la combustion. A la fin de ce processus, la soupape se ferme et le cylindre devient étanche.
- Une compression : le piston remonte jusqu'à son point mort supérieur et l'air comprimé dans la chambre de combustion passe à une très haute température, avoisinant les 500°C.
- Une combustion: le gasoil est ensuite injecté et s'enflamme immédiatement au contact de l'air comprimé, sans qu'un allumage soit nécessaire, à l'inverse des moteurs à essence. La combustion impulse au piston un violent mouvement descendant qui constitue le temps de travail proprement dit du moteur.
- Une expulsion : le cycle se conclut par l'ouverture de la soupape d'échappement et la remontée du piston qui facilite l'expulsion des gaz.

C'est au cours de la combustion que se forme la majorité des particules présentes dans les gaz d'échappement de moteur diesel. La différence entre les moteurs diesel et essence pour la formation des particules fines dépend du type d'injection. Les moteurs essence de deuxième génération avec une injection directe, proche du fonctionnement des moteurs diesel, génèrent plus de particules que les moteurs essence avec une injection indirecte. Avec une injection directe, le carburant est injecté dans l'air comprimé (faible pression et explosion avec la bougie) comme pour les moteurs diesel, alors qu'avec une injection indirecte, c'est un mélange air/carburant qui est envoyé dans la chambre de combustion et génère une combustion plus complète, réduisant la formation de particules fines.



Figure A.8 | Composition de la phase particulaire PM2,5. D'après (U.S.EPA 2002).





2.2.2. Composition des gaz d'échappement de moteur diesel

Les gaz d'échappement de moteur diesel sont un mélange complexe se divisant en trois fractions : une phase solide, une phase condensée et une phase gazeuse (Westerholm & Egeback 1994; Chan *et al.* 2007).

La phase solide (Particulate Matter ou PM) est majoritairement composée de particules carbonées primaires avec un noyau de carbone élémentaire ou « carbone suie » (présent sous forme de graphite) de 10 à 30 nm de diamètre (Figure A.8) (Liati & Eggenschwiler 2010; Bernard et al. 2014). Ces particules peuvent s'agglomérer et former des agrégats d'un diamètre allant de 60 à 100 nm. Les mécanismes de formation de ces particules au cours de la combustion sont complexes et seulement en partie connus. La voie principale de formation des particules serait la pyrolyse du carburant non brûlé et des huiles de lubrification, suivie de réactions de polymérisation et autres processus physico-chimiques (Steiner et al. 2016). En plus du carbone suie, cette phase solide contient des métaux et des métaux oxydés provenant des additifs des huiles de lubrification et du carburant ainsi que de l'usure du moteur. Ces additifs contiennent des éléments métalliques comme composants fonctionnels tels le zinc et le magnésium pour les huiles et le cérium, le fer, le manganèse, le platine et le cuivre pour le carburant (Mayer et al. 2010). A la température de combustion, ces additifs peuvent subir des processus de vaporisation, condensation ou nucléation, induisant leur intégration dans les particules carbonées et la formation de particules avec un noyau métallique et/ou formé d'oxydes de métal avec un diamètre allant jusqu'à 10nm (Burtscher 2005; Maricq 2007; Mayer et al. 2010). Par des phénomènes de coagulation, d'adsorption et de condensation, des composés organiques et soufre s'ajoutent à ces particules carbonées pour former des particules dites secondaires en raison de leurs modifications physicochimiques (Figure A.9). La fraction organique associée aux particules diesel provient du carburant non brûlé, de l'huile de lubrification présent dans les moteurs et en faible quantité de la combustion partielle et des produis de pyrolyse.

Le carbone suie reste le composant majeur de la phase solide (75%) (U.S.EPA 2002). Il possède une faible capacité à se dissoudre dans les tissus biologiques comme la muqueuse pulmonaire, ce qui suggère que la composition chimique élémentaire de la particule (carbone suie) joue un rôle dans la toxicité sans pour autant en être le facteur principal (Steiner *et al.* 2012; Ma *et al.* 2014). Cependant, les composés toxiques adsorbés

à la surface des particules ainsi que leurs propriétés physico-chimiques méritent une attention particulière (Bernard *et al.* 2014). Au cours de la combustion, les surfaces des particules carbonées deviennent chimiquement actives. Par exemple, l'oxydation partielle des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents à la surface et liés aux particules fait partie des mécanismes d'activation des particules. Une fois activées, les particules sont impliquées dans des processus oxydo-réducteurs avec la production de dérivés réactifs de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (Geller *et al.* 2006; Antinolo *et al.* 2015).

La phase gazeuse est composée à 99% de gaz inorganiques non toxiques comme l'azote, l'eau et l'oxygène. Le pourcentage restant est composé de gaz toxiques tels que le dioxyde de carbone (CO₂), le CO, le monoxyde d'azote et le NO₂. La fraction organique est caractérisée par de petites molécules comme le méthanol, l'éthylène ou le formaldéhyde mais surtout par des grosses molécules comme les HAP, les HAP nitrés et les composés aromatiques hétérocycliques (CAH).

La présence des composés organiques sous forme gazeuse dépend de la température de l'échappement ainsi que du poids moléculaire du composé. De plus, ils peuvent être adsorbés par les particules carbonées (**Figure A.9**) ou métalliques ou se condenser pour former des particules qui formeront avec des gouttes d'eau la phase liquide des gaz d'échappement de moteur diesel (Zielinska *et al.* 2004; Burtscher 2005). Pour la plupart de ces composés organiques, il est difficile de savoir s'ils appartiennent à la fraction gazeuse ou condensée, leur attribution dépendant de l'équilibre entre la condensation et l'évaporation, la concentration d'échappement et la disponibilité des noyaux et des surfaces pour la condensation.

Enfin, la composition de ces trois phases dépend fortement du type de moteur, du type de carburant et d'huile de lubrification et leurs additifs (Giakoumis *et al.* 2013; Imtenan *et al.* 2014; Popovicheva *et al.* 2015).

Les normes mises en place pour limiter les émissions de polluants atmosphériques ont évolué et évoluent encore à ce jour, modifiant ainsi la composition de la pollution de l'air. Cependant, les normes appliquées à la fabrication des nouveaux véhicules ne pourront avoir de réelles conséquences positives sur la pollution atmosphérique que lorsque la totalité des « anciens » véhicules auront été retirés de la circulation. Par exemple, en Europe, les normes en vigueur (EURO 6) exigent des taux d'oxyde d'azote Marqueurs mesurés représentatifs de l'exposition à la pollution atmosphérique : Afin d'estimer l'exposition des humains à la pollution atmosphérique, la concentration atmosphérique en différents polluants et d'autres paramètres est mesurée: - Oxydes d'azote_(NO, NO₂, NO_x) - PM₁₀ - PM_{2,5} - Carbone suie - HAP - SO₂ - O₃ - Benzène - Densité du trafic routier - Distance entre le lieu de résidence et une zone de trafic routier dense

Encart A.2 | Marqueurs de l'exposition à la pollution atmosphérique utilisés dans les études épidémiologiques

émis (en g/km) 6 fois plus faibles qu'en 2000 et jusqu'à 30 fois plus faibles pour les particules qu'en 1992 (européenne 2015). La composition des carburants subit aussi des évolutions afin de les rendre plus « propres ». Par exemple, la société Energenics développe actuellement un nanocatalyseur de combustion à base d'oxyde de cérium afin d'améliorer l'usage énergétique du carburant et de réduire les émissions de polluants atmosphériques (Energenics 2016).

2.3. Etudes des effets des gaz d'échappement de moteur diesel sur la santé

Différentes approches ont été proposées afin d'étudier les effets de la pollution atmosphérique et plus particulièrement des gaz d'échappement de moteur diesel sur la santé au cours du développement.

2.3.1. Etudes épidémiologiques chez l'Homme

L'analyse des effets de l'exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel pendant la grossesse sur le développement de l'unité fœto-placentaire nécessite une caractérisation de cette exposition. Différents modèles statistiques ont été développés pour évaluer les concentrations atmosphériques en polluants (e.g., NO₂ et PM) au moment de l'exposition aux gaz d'échappement de moteur diesel (**Encart A.2**). Ils prennent en compte l'adresse postale des femmes enceintes, des données gouvernementales relatives aux concentrations atmosphériques en polluants émis localement par le trafic routier, l'intensité du trafic routier ou la vitesse et l'orientation des vents. Il s'agit de modèles de « *Land Use Regression* » ou de combinaisons de modèles de dispersion (modèles mathématiques simulant la dispersion des polluants atmosphériques) (Vienneau *et al.* 2013; Padula *et al.* 2014; Fleisch *et al.* 2015; Lakshmanan *et al.* 2015; Olsson *et al.* 2015).

Des boitiers de mesure permettent d'évaluer la concentration atmosphérique en benzène par exemple, marqueur de la pollution de l'air, sans modèle mathématique. Ils mesurent la concentration à intervalles réguliers, permettant une caractérisation précise de l'exposition maternelle au benzène pendant la grossesse (Slama *et al.* 2009). Dans certaines études expérimentales, l'exposition d'adultes sains aux gaz d'échappement de moteur diesel peut être complètement contrôlée (exposition volontaire) (Mills *et al.* 2011).

2.3.2. Modèles expérimentaux chez l'animal

Des modèles animaux sont utilisés afin de clarifier les mécanismes sous-jacents aux effets d'une exposition maternelle à la pollution atmosphérique en gestation, dans un contexte contrôlé. Les études citées par la suite impliquent une exposition directe des animaux à un air ambiant pollué, une exposition directe des animaux à des gaz d'échappement produits par un moteur spécifique ou une exposition indirecte par instillation intranasale, gavage oral ou injections intraveineuses, sous-cutanées ou intrapéritonéale des animaux à des nanoparticules manufacturées.

Des conditions proches des conditions d'exposition chez l'Homme sont obtenues à l'aide de modèles d'inhalation développés essentiellement chez les rongeurs. Les animaux peuvent être exposés à l'air pollué au sein de chambres d'exposition (Veras *et al.* 2008; Laskin *et al.* 2010; Campen *et al.* 2014). Avec cette méthode, le corps entier de l'animal est exposé, induisant une contamination supplémentaire à l'inhalation par l'ingestion d'éventuelles particules par le léchage du pelage. Les animaux peuvent aussi être exposés à l'air pollué par inhalation stricte grâce à un dispositif « nose-only » impliquant une exposition au niveau nasal seulement et non sur tout le corps (dispositif utilisé dans notre étude) (Stinn *et al.* 2005; van Berlo *et al.* 2010).

Des conditions moins représentatives d'une exposition chez l'Homme sont utilisées pour étudier plus en détail les mécanismes d'absorption et de dégradation des particules et/ou contrôler davantage de paramètres de l'exposition (e.g., la quantité de particules inhalées ou circulantes). Dans des modèles rongeurs, l'instillation intranasale ou intratrachéale permet de contrôler la quantité de particules atteignant les poumons (Kyjovska *et al.* 2015; Yoshizaki *et al.* 2015), tandis que certaines nanoparticules manufacturées sont parfois ingérées par gavage oral (Hong *et al.* 2014a; Hong *et al.* 2014b; Yu *et al.* 2014) ou directement injectées par voie intraveineuse (Sumner *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012; Bai & van Eeden 2013; Qi *et al.* 2014), sous-cutanée (Ghaderi *et al.* 2015; Yokota *et al.* 2015) ou plus rarement par voie intrapéritonéale (Di Bona *et al.* 2014).

2.4. Réglementations et recommandations

La première règlementation des émissions de gaz d'échappement a été mise en place en 1967 par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (USEPA). En France, Air Parif, association agréée par le ministère de l'Environnement pour la

	Polluants Valeurs limites Seuil de recommandation Seuil d'alerte et d'information		Seuil d'alerte	Objectifs de qualité	
Phase particulaire Phase gazeuse	Dioxyde d'azote (NO₂)	Moyenne annuelle (2010): 40 μg/m ³ Moyenne horaire (2010): 200 μg/m ³ (à ne pas dépasser plus de 18h/an)	Moyenne horaire : 200 µg/m³	Moyenne horaire : 400 μg/m³(si dépassé sur 3h consécutives) 200 μg/m³ (si dépassé la veille et risque le lendemain)	Moyenne annuelle : 40 µg/m³
	Monoxyde de carbone (CO)	Maximum journalier de la moyenne sur 8 heures: 10000 µg/m ³			
	PM10	Moyenne annuelle (2005): 40 μg/m ³			Moyenne annuelle : 30 µg/m³ (2005) et 25 µg/m³ (2012)
		Moyenne journalière (2005 et 2012) : 50 µg/m ³ (à ne pas dépasser plus de 35 jours/an	Moyenne journalière : 50 µg/m³	Moyenne journalière : 8ο μg/m³	
	PM2,5	Moyenne annuelle (2015): 25 µg/m ³			Moyenne annuelle : 10 µg/m³
			Moyenne journalière : 30 µg/m ³	Moyenne journalière : 50 µg/m ³	

Tableau A.4 | Récapitulatif des valeurs limites, des seuils et des objectifs de qualité pour différents polluants atmosphériques en Europe.

Définitions données par Air Parif (AirParif 2008):

<u>Valeur limite</u> : niveau atteint dans un délai donné, à ne pas dépasser et fixé sur la base des connaissances scientifiques afin d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ou sur l'environnement dans son ensemble.

<u>Seuil d'information et de recommandation</u> : niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé humaine de groupes particulièrement sensibles au sein de la population. Ce niveau d'exposition rend nécessaire l'émission d'informations immédiates et adéquates à destination de ces groupes et des recommandations pour réduire certaines émissions.

<u>Seuil d'alerte</u> : niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé de l'ensemble de la population ou de dégradation de l'environnement, justifiant des interventions d'urgence.

<u>Objectif de qualité</u> : niveau à atteindre à long terme et à maintenir, sauf lorsque cela n'est pas réalisable par des mesures, afin d'assurer une protection efficace de la santé humaine et de l'environnement dans son ensemble.

surveillance de la qualité de l'air en région Ile de France, définit des « valeurs limites », des « seuils d'information, de recommandation et d'alerte » et des « objectifs de qualité » (Parif 2010; AirParif 2016a). Ces termes sont définis dans la légende du **Tableau A.4**.

2.4.1. A l'échelle mondiale

En 2005, l'OMS a publié une synthèse présentant les effets de la pollution atmosphérique sur la santé en fonction des principaux polluants et les valeurs seuils audelà-desquelles la pollution atmosphérique est considérée comme nuisible à la santé (OMS 2005). Cette synthèse stipule que la mortalité due à la pollution de l'air pourrait être réduite de 15 % si la concentration atmosphérique en PM_{10} était réduite de 70 à 20 $\mu g/m^3$.

Les valeurs seuils publiées par l'OMS pour la fraction particulaire sont de :

- PM_{10} : 20 µg/m³ en moyenne annuelle et 50 µg/m³ en moyenne journalière.
- $PM_{2,5}$: 10 µg/m³ en moyenne annuelle et 25 µg/m³ en moyenne journalière.

Les valeurs seuils publiées par l'OMS pour le NO₂ est de 40 μ g/m³ en moyenne annuelle et 200 μ g/m³ en moyenne journalière (OMS 2005).

2.4.2. A l'échelle européenne et française

Les réglementations appliquées en Europe et particulièrement en France sont indiquées dans le **Tableau A.4** (Parif 2010). Il est intéressant de noter que la majorité des polluants atmosphériques sont suffisamment étudiés pour être réglementés, mais que certains ne sont soumis à aucune recommandation, comme les nanoparticules, le carbone suie ou les HAP (hormis le benzène dont la valeur limite en moyenne annuelle s'élève à 5 μ g/m³ avec un objectif de qualité à 2 μ g/m³). De plus, la fraction particulaire PM_{2,5} est soumise à des objectifs supplémentaires de réduction, calculés à partir des concentrations relevées les années précédentes.

La pollution atmosphérique est un problème mondial majeur de santé publique ayant causé 3,7 millions de décès prématurés en 2012. Cette pollution est principalement liée aux gaz d'échappement de moteur diesel.

Ces gaz d'échappement ont une composition complexe, définie par un mélange de gaz et de particules solides interagissant pour former de nouveaux composés actifs encore plus toxiques.

Lors de la fabrication des moteurs diesels, la concentration de particules et gaz toxiques émis est soumise à des réglementations. Cependant, ces réglementations ne sont pas toujours respectées.

Le deuxième niveau de réglementations concerne la concentration de particules émises par le trafic routier. Dans ce cadre, l'OMS incite les pays développés et en développement à réagir face aux pics de pollution de plus en plus fréquents. Pour cela, l'OMS fixe des valeurs limites, des seuils d'information, de recommandation et d'alerte permettant la sensibilisation de la population, ainsi que des objectifs de qualité de l'air à atteindre chaque année.



Figure A.10 | Le placenta : à l'interface entre la mère et le fœtus

Description du placenta comme interface entre la mère et le fœtus, exerçant un grand nombre de fonctions et s'adaptant à l'exposome maternel (environnement maternel) pour maintenir la croissance et le développement fœtal.

Espèces	Entrée dans l'utérus (Stade embryonnaire)	Perte de la zone pellucide	Implantation (Stade embryonnaire)	Placenta définitif	Durée de la gestation
Lapin	3 (morula)	6,5	6,5 (gastrula)	-	30-32
Homme	3-4 (morula)	5	6-7 (blastocyste)	90	280
Souris	3 (morula)	4	4,5 (blastocyste)	14,5	19-21
Rat	3-4 (morula)	5	5,5	-	22

Tableau A.5 | Chronologie comparée de la gestation Toutes les valeurs sont exprimées en jours post-conception (jpc).



Figure A.11 | Anatomie utérine comparée

Utérus double ou « duplex » des rongeurs et lagomorphes, utérus simple de l'Homme.

3. Placenta

Le placenta est un organe autonome et transitoire, à l'interface entre la mère et le fœtus. Il résulte d'interactions cellulaires et moléculaires spécifiques entre la paroi utérine maternelle (voir **A§3.1.1.**) et les tissus extra-embryonnaires (voir **A§3.1.1.2.**). Le placenta exerce différentes fonctions lui permettant de contrôler et de maintenir la croissance fœtale, comme des échanges de nutriments et de gaz (voir **A§3.3.**) et des fonctions endocrines (voir **A§3.4.**), métaboliques et immunitaires (**Figure A.10**). Il protège le fœtus d'un rejet par le système immunitaire maternel (Le Bouteiller & Sargent 2000; Cross 2005; Le Bouteiller 2014). Grâce à son rôle d'interface, le placenta s'adapte aux facteurs intrinsèques et extrinsèques de l'environnement fœto-maternel. Le placenta est donc l'agent principal de la programmation développementale (voir **A§3.5.**).

Pour des raisons de clarté, la suite de ce chapitre décrira particulièrement le placenta de l'Homme et donnera des indications sur celui des rongeurs et du lapin, modèle utilisé dans cette thèse.

3.1. Structure du placenta

3.1.1. Composition du placenta

3.1.1.1. Composante maternelle

Chez les mammifères, le développement de l'embryon commence par une période pré-implantatoire, dont la longueur varie entre les espèces. Elle s'étend de la fécondation dans l'oviducte à l'implantation dans l'utérus (**Tableau A.5**). L'utérus permet le développement de l'embryon jusqu'à la mise en place du placenta, c'est-à-dire l'implantation. L'anatomie utérine varie en fonction des espèces. Chez l'homme, l'utérus est simple et se distingue par un corps utérin volumineux et un col uniques. Chez les rongeurs et les lagomorphes, la séparation entre les utérus gauche et droit est complète. Les deux cornes utérines, les deux corps utérins et les deux cols définissent un utérus double ou « duplex » (**Figure A.11**) (Tarrade *et al.* 2014a).

L'utérus est composé d'une couche musculaire externe, appelée myomètre, ainsi que d'une couche glandulaire interne et d'une couche luminale de cellules épithéliales qui forment l'endomètre. Plus précisément, l'endomètre est constitué d'un épithélium luminal simple reposant sur du tissu conjonctif. Il contient un grand nombre de glandes



Figure A.12 | Du blastocyste au conceptus : formation des membranes

La composante extra-embryonnaire du placenta est formée par le trophectoderme (ou trophoblaste), tandis que les autres tissus placentaires (mésoderme), et extraplacentaires (sac vitellin et allantoïde) sont dérivés de l'embryon (Tarrade et al. 2014).



Figure A.13 | Classification histologique des placentas hémochoriaux

Cette dassification prend en compte le nombre de couches cellulaires séparant le sang maternel du sang fœtal. Chez l'humain, le placenta est de type hémodichorial, puis la couche de cytotrophoblastes devient discontinue pour former un placenta de type hémomonochorial à terme. Le lapin a un placenta de type hémodichorial et les rongeurs, de type hémotrichorial.

VF: Vaisseau fœtal; SF : Sang fœtal; MB : Membrane basale; Sy : Syncytiotrophoblaste; Cy : Cytotrophoblaste; EM : Espace sanguin maternel.

utérines s'ouvrant sur la lumière endométriale. Au début de l'implantation, l'embryon établit de fortes interactions avec l'endomètre qui aboutissent à son ancrage.

3.1.1.2. Mise en place du placenta

3.1.1.2.1. Trophoblaste

Lors de la formation de l'embryon, les cellules s'organisent en trois feuillets, le feuillet extérieur s'appelle l'ectoderme, le feuillet central est le mésoderme et le feuillet interne est nommé endoderme. Toutes les membranes extra-embryonnaires sont différenciées au cours de l'ontogenèse des trois feuillets embryonnaires.

Au stade blastocyste, deux masses cellulaires se distinguent : la masse cellulaire interne à l'origine de l'embryon et la masse cellulaire externe, ou trophoblaste, à l'origine du placenta. Au cours du stade blastocyste, le trophoblaste se différencie en épithélium. Après migration et fusion avec le mésoderme extra-embryonnaire, le trophoblaste forme le chorion enveloppant l'embryon, puis le fœtus et ses annexes (**Figure A.12**). La fonction principale du chorion est les échanges gazeux (Ferner & Mess 2011). Le trophoblaste est le siège des échanges nutritionnels. Sa structure, définie par l'apposition des différentes couches de cellules trophoblastiques, varie selon les espèces (**Figure A.13**) (Furukawa *et al.* 2014). Chez les humains comme chez les rongeurs et les lagomorphes, 1) une couche de cytotrophoblastes est maintenue et 2) une couche de syncytiotrophoblastes se forme suite à la fusion des cellules cytotrophoblastiques mononucléées entre elles. Les syncytiotrophoblastes assurent les fonctions placentaires (Alsat *et al.* 1999).

3.1.1.2.2. Implantation et développement placentaire

Chez l'Homme, le trophoblaste s'insinue dans l'endomètre et forme des villosités placentaires dont la couche externe est composée de cellules syncytiotrophoblastiques et la couche interne, de cellules cytotrophoblastiques. Les villosités placentaires sont constituées d'un axe mésenchymateux et de vaisseaux sanguins fœtaux. En contact avec le sang maternel présent dans la chambre intervilleuse, ils permettent les échanges fœtomaternels. Dans les espèces chez lesquelles l'implantation est invasive (dont les primates, rongeurs et lagomorphes), il existe une réaction déciduale dans le stroma utérin. D'un point de vue cellulaire, la réaction déciduale consiste en une différenciation épithéliale des fibroblastes du stroma, associée à leur prolifération et à leur polyploïdie sous

l'influence des hormones stéroïdes. Les cellules déciduales produisent du glycogène, de la phosphatase alcaline, de l' α -actine, de la prolactine et des facteurs de croissance tels que TGF- β (*Transforming Growth Factor-* β), IGF (*Insulin-like Growth Factor*), IGF-BP1 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1*) et TNF- α (*Tumor Necrosis Factor \alpha*). Les cellules déciduales jouent donc un rôle dans la croissance et la différenciation du trophoblaste. Chez les rongeurs, la décidualisation est limitée au site d'implantation, alors que chez les primates, tout l'endomètre est affecté (pour revue (Chavatte-Palmer & Guillomot 2007)).

3.1.1.2.3. Annexes embryonnaires

L'amnios est la membrane formant une poche contenant le fœtus en développement dans le liquide amniotique. Chez la majorité des mammifères, l'amnios n'est pas directement impliqué dans la formation du placenta. Il exerce pourtant le rôle de barrière entre le fœtus et les facteurs externes.

Le sac vitellin est apparu le premier au cours de l'évolution des espèces. Chez les vertébrés amniotes, il joue un rôle important dans la régulation et la mobilisation des nutriments pour les embryons ovipares et contribue aux échanges fœto-maternels dans beaucoup d'espèces vivipares (Ferner & Mess 2011). Le sac vitellin provient de l'association entre le mésoderme et l'endoderme. Son devenir au cours de la gestation dépend des espèces (Ferner & Mess 2011). Chez la plupart des rongeurs, il participe à la formation d'un placenta chorio-vitellin après l'inversion de ses membranes, c'est-à-dire que les villosités placentaires choriales sont irriguées par la circulation sanguine provenant de la vésicule vitelline. Chez la souris, la formation d'un placenta chorio-vitellin temporaire précède la formation du placenta définitif. Chez les lagomorphes, le sac vitellin perdure jusqu'à la fin de la gestation, où il joue un rôle important de transfert de l'immunité passive au fœtus. Il est aussi impliqué dans le transfert de fer lié à la transferrine, de la vitamine B12, de lipides ou encore de protéines (Carter & Enders 2016). Chez les primates, il disparaît rapidement au moment de l'apparition de l'allantoïde (Celio *et al.* 2008; Tarrade *et al.* 2014a).

L'allantoïde apparaît d'abord comme un bourgeonnement d'origine endodermique à partir de l'intestin primitif où il est en association étroite avec le système urogénital embryonnaire. Le diverticule allantoïdien est ensuite recouvert par le mésoderme extra-embryonnaire où se développent les vaisseaux allantoïdiens formant

	Nom	Description	Espèces
Morphologie	Diffus	Recouvre la totalité de la surface de l'épithélium utérin	Suidés, équidés, cétacés
	Cotylédonaire	Distribution des villosités en cotylédons le long du sac chorionique allongé occupant le volume des cornes utérines	Ruminants
	Zonal	Présente un anneau équatorial ceinturant le sac chorionique où sont rassemblées les villosités placentaires	Carnivores
	Discoïde/ Bidiscoïde	Caractérisé par un disque simple (souris, homme) ou double (lapin, macaque). Homme : villosités sont regroupées en amas formant une vingtaine de pseudo-cotylédons	Primates, rongeurs, lagomorphes
Organisation	Plissé	Chorion suit la forme plissée de l'épithélium utérin	Suidés
	Villeux	Villosités sont constituées d'une colonne de trophoblaste (villosités primaires), puis le mésoderme s'y infiltre (villosités secondaires) puis infiltration des vaisseaux fœtaux (villosités tertiaires)	Ruminants, primates , équidés
	Labyrinthique	Zone labyrinthique (échanges fœto-maternels) forme un réseau de villosités chorioniques fusionnées entourant les lacunes sanguines maternelles. Rongeurs et lagomorphes : zone jonctionnelle (ou spongiotrophoblaste) qui permet l'ancrage du placenta à la paroi utérine	Rongeurs, lagomorphes, carnivores
Histologie	Epithélio- chorial	Pas d'invasion de l'épithélium utérin, 6 couches entre le sang maternel et fœtal	Suidés, équidés, cétacés
	Synépithélio- chorial Type épithéliochorial avec un syncytium (masses cellulaires plurinuclées d'origine maternelle et fœtale) intercalé parmi les cellules épithéliales utérines		Ruminants
	Endothélio- chorial	Syncytiotrophoblaste en contact direct avec endothélium des capillaires utérins sans invasion (4 couches séparent les 2 circulations)	Carnivores
	Hémochorial	Tous les tissus endométriaux sont érodés, donc contact direct entre chorion et circulation maternelle. Primates et lagomorphes : hémodichorial > 1 couche de syncytiotrophoblaste repose sur 1 couche de cytotrophoblaste basal. Rongeurs : hémotrichorial > 1 couche de cytotrophoblaste apposée sur 2 couches de syncytiotrophoblaste	Primates, lagomorphes, rongeurs

Tableau A.6 | Classification des différentes placentations

Description des différents types de placentation. Les espèces nous intéressant dans ce travail apparaissent en gras (primates, lagomorphes et rongeurs).



Figure A.14 | Classification morphologique des placentas Cette première classification permet de différencier les placentas selon leur morphologie (Furukawa, S., et al. (2014)).



Figure A.15 | Photo d'un placenta de lapin à 28 jours de gestation (vu côté fœtal) Le placenta de lapin est bidiscoïde, labyrinthique et hémodichorial.



Figure A.16 | Formation des villosités placentaires dans le placenta humain
Tout d'abord, une colonne de trophoblaste se forme (villosités primaires), ensuite le mésoderme s'y infiltre (villosités secondaires) et enfin les vaisseaux sanguins fœtaux apparaissent (villosités tertiaires). D'après (Tarrade et al. 2014)

ensuite les vaisseaux ombilicaux. L'allantoïde est un organe richement vascularisé stockant la majorité des déchets fœtaux et facilitant les échanges gazeux (Ferner & Mess 2011). Chez les rongeurs, lagomorphes et primates, l'allantoïde régresse tôt dans la gestation pour ne devenir qu'un diverticule enfermé dans la paroi du cordon ombilical (Tarrade *et al.* 2014a).

3.1.2. Classifications des différents types de placentations

Il existe une large diversité de morphologies placentaires selon les espèces animales. Les variations de la morphologie placentaire visent à augmenter la surface d'échange entre le sang maternel et fœtal. Les types de placentation sont classés en fonction de la morphologie du placenta, de l'organisation de l'interface materno-fœtale et de la structure histologique de cette interface, en particulier du nombre de couches cellulaires présentes entre le sang maternel et fœtal (Furukawa *et al.* 2014; Tarrade *et al.* 2014a) (**Tableau A.6**).

Pour des raisons de clarté, la suite de ce paragraphe détaillera les placentations de l'Homme, du lapin et des rongeurs. Le tableau récapitulatif et la **Figure A.14** présentent néanmoins la placentation des mammifères en général (**Tableau A.6**).

3.1.2.1. Classification morphologique

Cette classification s'appuie sur la morphologie placentaire (Figure A.14).

Chez l'Homme, le placenta est de type discoïde (disque simple) comme chez la souris. Le rat et le lapin, eux, présentent un placenta bidiscoïde (**Figure A.15**).

3.1.2.2. Classification organisationnelle

Cette classification se base sur l'architecture des membranes chorioniques en contact avec le tissu utérin.

Chez l'Homme, les villosités chorioniques se développent selon une chronologie spécifique. Tout d'abord, une colonne de trophoblaste se forme (villosités primaires), ensuite le mésoderme s'y infiltre (villosités secondaires) et enfin les vaisseaux sanguins fœtaux apparaissent (villosités tertiaires) (**Figure A.16**). De plus, chez l'homme les villosités sont regroupées en amas formant ainsi une vingtaine de pseudo-cotylédons (**Figure A.17**).

Chez les rongeurs et les lapins, le placenta est de type labyrinthique, c'est-à-dire que la zone d'échange fœto-maternelle (dite zone labyrinthique) forme un réseau de villosités chorioniques fusionnées entourant les lacunes sanguines maternelles. De plus, il existe dans ces espèces une zone jonctionnelle (ou spongiotrophoblaste) qui permet l'ancrage du placenta à la paroi utérine.

3.1.2.3. Classification histologique

Cette classification est basée sur la relation histologique établie entre le chorion et la paroi utérine comprenant les différentes couches cellulaires qui séparent la circulation maternelle de la circulation fœtale.

Le placenta des primates, des lagomorphes et des rongeurs est invasif et de type hémochorial, c'est-à-dire que le chorion est en contact direct avec le sang maternel. L'invasion trophoblastique implique la lyse de l'épithélium utérin, la pénétration de la lame basale et la migration à travers le stroma utérin jusqu'à la circulation sanguine maternelle. Dans sa forme finale, le chorion baigne directement dans le sang maternel. Chez l'homme et le lapin, le placenta est dit hémodichorial, c'est-à-dire qu'une couche de syncytiotrophoblaste repose sur une couche de cytotrophoblaste basal. Chez les rongeurs, une couche de cytotrophoblaste est apposée sur deux couches cellulaires de syncytiotrophoblaste basal, ce placenta est défini comme hémotrichorial.

3.2. Vascularisation et flux sanguins placentaires

3.2.1. Mise en place de la vascularisation fœto-placentaire

Dans la mise en place d'un réseau vasculaire, deux processus successifs se distinguent. La vasculogenèse induit une formation *de novo* de vaisseaux sanguins à partir des hémangioblastes, précurseurs des cellules endothéliales dérivées du mésoderme. L'angiogenèse représente la création de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants en impliquant différents processus (Risau & Flamme 1995; Risau 1997).

Chez l'Homme, la vasculogenèse commence aux alentours du 21^{ème} jour de grossesse avec une différenciation *in situ* des hémangioblastes, précurseurs des cellules endothéliales et hématopoïétiques (Knoth 1968; Demir *et al.* 1989; Charnock-Jones *et al.* 2004). Les premières lumières vasculaires apparaissent 23 jours après la fécondation. La


Figure A.17 | Le placenta humain – Morphologie et circulation sanguine

Le placenta humain est de type hémochorial villeux. Il est formé de cotylédons du côté maternel. Les artères spiralées sont remodelées au cours de la placentation. Les artères apparaissent en rouge et les veines en bleu.

différenciation des hémangioblastes est induite par le facteur VEGF α (*Vascular Endothelial Growth Factor*) qui est produit par les cellules trophoblastiques pendant les premières semaines de grossesse et qui agit *via* deux récepteurs, VEGFR-1 et VEGFR-2. Ce facteur est aussi un puissant activateur de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales, donc de la formation de vaisseaux et de la perméabilité vasculaire (Burton *et al.* 2009). Le trophoblaste produit d'autres facteurs pro-angiogéniques comme le PIGF (*Placental Growth Factor*) qui induit la formation de nouveaux vaisseaux ainsi que la production d'angiopoïétine (De Falco 2012). Au cours de la grossesse, VEGF α est très exprimé en début de grossesse et peu en fin de grossesse alors que PIGF a une cinétique d'expression inverse (Khaliq *et al.* 1996; Khaliq *et al.* 1999). L'expression de PIGF est stimulée par l'oxygène contrairement à VEGF α (Khaliq *et al.* 1999). Comme décrit cidessous, la formation du placenta se fait en condition pauvre en oxygène pendant le premier trimestre de la grossesse, favorisant la mise en place de la vasculogenèse et de l'angiogenèse.

Chez l'Homme, l'angiogenèse fœto-placentaire façonne la structure des villosités placentaires (Mayhew 2002). Au cours de la grossesse, la croissance du réseau de capillaires sanguins se réalise en deux phases. La phase initiale consiste en une angiogenèse avec branchement du 32^{eme} jpc à 25 semaines de grossesse, avec la formation de fins capillaires spiralés, suivie d'une deuxième phase d'angiogenèse sans branchement à partir de la 25^{eme} semaine de grossesse, avec la formation de capillaires plus longs (Kaufmann *et al.* 2004).

3.2.2. Invasion trophoblastique et remodelage des artères spiralées

3.2.2.1. Chez l'Homme

Chez l'Homme, la vascularisation utéro-placentaire se divise en quatre niveaux d'artères. Tout d'abord, les artères utérines se subdivisent en artères arquées au sein du myomètre, qui se ramifient ensuite pour former les artères radiaires traversant le myomètre. Ces dernières se transforment en artères spiralées au niveau de l'endomètre. Le dernier niveau est constitué d'artères basales qui permettent la vascularisation de l'endomètre profond et qui proviennent des artères radiaires (**Figure A.17**).

La cellule trophoblastique est la cellule essentielle du placenta. Elle se différencie d'une part en cellules du cytotrophoblaste villeux qui assurent les échanges fœto-



Figure A.18 | Villosités placentaires dans le placenta humain

Les cytotophoblastes extravilleux envahissent la paroi utérine, tandis que les cytotrophoblastes intravasculaires composent les « bouchons » trophoblastiques dont la disparition en fin de premier trimestre permet l'entrée du sang dans l'espace intervilleux.

CT: Cytotrophoblaste.

maternels et les fonctions endocrines du placenta, et d'autre part en cellules du cytotrophoblaste extravilleux invasif, indispensables à l'implantation et au remodelage des vaisseaux utérins. Les cellules du cytotrophoblaste villeux fusionnent et forment le syncytiotrophoblaste. Le cytotrophoblaste extravilleux prolifère puis devient invasif et migre dans la décidue et le myomètre. Il colonise aussi les artères spiralées et forme les bouchons trophoblastiques qui en obstruent la lumière de la partie terminale. Au premier trimestre de la grossesse, la cellule trophoblastique se développe en condition d'hypoxie. Cette condition physiologique semble être nécessaire à sa survie. Les bouchons trophoblastiques disparaissent progressivement à la fin du premier trimestre de grossesse permettant ainsi une perfusion progressive de la chambre intervilleuse et une augmentation de la pression partielle en oxygène (**Figure A.18**).

L'unité fonctionnelle du placenta est la villosité choriale, possédant deux types : les villosités crampons qui sont ancrées à l'endomètre maternel et les villosités flottantes au sein de la chambre intervilleuse (**Figure A.18**).

Progressivement, les artères spiralées subissent une transformation en artères utéro-placentaires dans la zone d'implantation, en lien avec l'invasion trophoblastique. Ce processus physiologique de remodelage des artères spiralées est crucial au bon développement du fœtus (Pijnenborg *et al.* 2006). Ce remodelage artériel est divisé en trois étapes :

- Un remodelage vasculaire myométrial indépendant de l'invasion trophoblastique : désorganisation généralisée des artères par une vacuolisation endothéliale, désorganisation des cellules musculaires lisses et dilatation luminale.
- Un remodelage vasculaire induit par des facteurs diffusibles issus du trophoblaste invasif : amincissement de la média et dépôts fibrinoïdes au sein de la paroi artérielle.
- Un remodelage induit par une interaction directe entre le trophoblaste invasif et les composants de la paroi artérielle : destruction de la paroi musculaire lisse des vaisseaux remplacée par une substance fibrinoïde.

Ce remodelage des artères spiralées permet un contact direct entre le cytotrophoblaste extravilleux et les parois des artères maternelles. Les cellules endothéliales maternelles sont ensuite remplacées par le trophoblaste extravilleux

permettant la mise en place d'artères atones échappant au contrôle neuro-vasculaire et aux médiateurs du tonus vasculaire. Ces modifications ultrastructurales permettent par la suite l'importante augmentation du débit sanguin en faveur du placenta (**Figure A.18**).

Au cours de la grossesse, le flux sanguin placentaire augmente fortement pour assurer la survie et la croissance fœtale *via* l'apport de nutriments (Reynolds & Redmer 1995; Reynolds *et al.* 2005). Cette augmentation du flux sanguin est principalement due à l'angiogenèse, la vasodilatation et le remodelage vasculaire (Osol & Mandala 2009).

3.2.2.2. Chez le lapin

Chez le lapin, l'invasion est superficielle, ne semble pas atteindre le myomètre et est du même type que chez l'homme où les cellules du syncytiotrophoblaste fusionnent avec les cellules maternelles pour former un syncytium contenant les noyaux fœtaux et maternels (Chavatte-Palmer & Guillomot 2007). Dans cette espèce, les cellules géantes placentaires de la zone jonctionnelle d'origine trophoblastique et présentes chez le lapin à partir de 10 jpc, mais absentes chez l'homme, sont impliquées dans le remodelage des artères spiralées en remplaçant les cellules endothéliales (Larsen 1962). Ces cellules ont été caractérisées comme ayant une structure proche des cellules cytotrophoblastiques humaines mais aucune fonction précise n'a encore été mise en évidence.

Des changements hémodynamiques interviennent de façon comparable à l'humain, avec une importante augmentation de la pression sanguine maternelle au cours de la gestation (Fischer *et al.* 2012). Les villosités trophoblastiques fusionnent entre elles, impliquant une anastomose des vaisseaux fœtaux présents dans ces villosités (Yllera *et al.* 2003).

3.2.2.3. Chez les rongeurs

Chez les rongeurs, la zone jonctionnelle est aussi composée de cellules trophoblastiques géantes qui représentent la couche externe du cône ectoplacentaire, défini par un épaississement conique du trophoblaste à une extrémité du cylindre embryonnaire au cours du développement (Georgiades *et al.* 2002). Ce cône commence à se former au stade blastocyste et est composé de trophectoderme. Chez la souris, l'invasion trophoblastique se limite à la décidue alors que le rat est plus proche de l'homme avec une invasion jusqu'au myomètre (Wooding & Flint 1994). Chez les



Multivilleux

Courant croisé

Contre-courant

Figure A.19 | Différents types de flux sanguins materno-fœtaux

Le placenta humain présente un arrangement vasculaire de type multivilleux. Le type « courant croisé » est observé dans les placentas des primates non hominidés, des carnivores et des porcs. La circulation à contre-courant est observée chez les rongeurs et les lagomorphes. D'après (Tarrade *et al.* 2014).

rongeurs, comme chez le lapin, le placenta est de type labyrinthique, c'est-à-dire avec des villosités terminales fusionnées (Georgiades *et al.* 2002). Cependant, le nombre de couches cellulaires trophoblastiques est au nombre de trois comparées à deux chez le lapin et chez l'humain.

3.2.3. Circulation utéro-placentaire

Chez l'homme, le sang maternel parvient jusqu'à la chambre intervilleuse par les artères spiralées remodelées par les cellules trophoblastiques. Les flux sanguins sont contrôlés par une combinaison de paramètres physiologiques (augmentation de la perfusion et diminution de l'impédance vasculaire) et de changements dans l'anatomie de la vascularisation (augmentation du diamètre des vaisseaux, réduction de leur longueur, réseaux vasculaires en parallèle plutôt qu'en série) (Kaufmann *et al.* 2004). La résistance du flux sanguin est corrélée à la longueur des vaisseaux et inversement liée au carré de la surface de la section du vaisseau (Equation de Poiseuille). Ainsi, l'avantage de l'arrangement en parallèle permet de réduire la longueur des vaisseaux, donc de réduire l'impédance. L'anatomie du réseau vasculaire influence l'impédance vasculaire de deux manières : par la dimension et par l'arrangement spatial des vaisseaux sanguins. Les changements vasculaires mis en place pour répondre aux demandes fœtales se font par le biais d'adaptations mettant en jeu ces principes.

La direction du flux sanguin maternel par rapport au flux sanguin fœtal varie en fonction de la structure placentaire. Chez l'homme, qui possède un placenta de type hémochorial, l'arrangement vasculaire est multivilleux, c'est-à-dire que le sang maternel est en contact avec le syncytiotrophoblaste dans la chambre intervilleuse (**Figure A.19**). Chez le lapin et les rongeurs, le sang fœtal arrive au placenta par les artères ombilicales qui se divisent pour former un réseau de capillaires dans la zone labyrinthique. Le réseau veineux ramène ensuite le sang oxygéné vers la plaque choriale. Contrairement à la circulation fœtale, le sang maternel s'écoule librement dans les espaces sanguins maternels suivant les colonnes trophoblastiques de la plaque choriale vers la décidue. Les lagomorphes, tout comme les rongeurs, possèdent donc le type de circulation le plus efficace, c'est-à-dire une circulation à contre-courant qui optimise les capacités de transfert et d'échanges (**Figure A.19**).



Figure A.20 | Différents types de transport transplacentaire à travers le syncytiotrophoblaste

1 : Diffusion passive ; 2: Transport facilité ; 3 : Co-transport ; 4 : Co-transport (échange) ; 5 : Transport actif ; 6 : Canaux ioniques ; 7 : Endocytose. D'après (Desforges & Sibley 2010). O_2 : Dioxygène ; Glu : Glucose ; AA : Acides Aminés ; Na⁺ : Ion Sodium ; H⁺ : Ion Hydrogène ; ATP : Adénosine-5'-Triphosphate ; Cl⁻ : Ion Chlorure ; K⁺ : Ion Potassium ; Ig : Immunoglobuline.

3.3. Transferts transplacentaires

Le transport des nutriments à travers les membranes placentaires se fait via différents mécanismes en fonction de la molécule (Figure A.20). Les gaz, comme le dioxygène, traversent le placenta par diffusion simple. Il existe des canaux ioniques au sein des membranes placentaires qui permettent une diffusion passive, sélective et saturable, des ions. Certaines molécules traversent la barrière placentaire par diffusion facilitée grâce à des transporteurs. Ces derniers se lient de manière sélective à leur substrat, l'ensemble est ensuite transloqué d'un côté de la membrane à l'autre. Ce mécanisme est saturable et il peut utiliser de l'énergie fournie par le gradient électrochimique dominant (diffusion facilitée), comme les transporteurs des sucres (GLUT) ou par hydrolyse de l'ATP (transport actif), pour le transfert de certains ions. Lorsque ces protéines membranaires permettent le transfert de plus d'un substrat à la fois, on parle de co-transport, voie empruntée pour le transport des acides aminés. Le cotransport se fait soit dans la même direction pour les deux substrats soit sous forme d'échange. Les transporteurs peuvent aussi exploiter les gradients générés par les pompes en associant les transferts de substrats avec celui de Na⁺, par exemple. D'autres nutriments et molécules nécessaires à la croissance fœtale peuvent traverser les cellules trophoblastiques via les mécanismes d'endocytose/exocytose, comme les immunoglobulines ou le fer par exemple (Desforges & Sibley 2010).

Pour des raisons de clarté, la suite de ce paragraphe n'abordera que l'expression de ces transporteurs chez l'homme, les rongeurs et les lagomorphes. Seront présentés le transport de l'oxygène, du glucose, des acides aminés et des acides gras, éléments essentiels à la croissance fœtale. Le choix de la présentation du transfert du fer est lié aux résultats présentés par la suite.

3.3.1. Transfert de l'oxygène

La fonction « respiratoire » du placenta permet l'apport en oxygène et l'évacuation du CO_2 fœtal. Les gaz sanguins diffusent passivement à travers les membranes. Le transfert de l'oxygène se fait grâce au gradient de pression en oxygène, plus élevée dans la circulation maternelle que dans la circulation fœtale (Kaufmann *et al.* 2004). Chez l'homme, l'hémoglobine fœtale a une affinité plus importante pour l'oxygène que l'hémoglobine adulte, ce qui facilite son transport (Celio *et al.* 2008). Cette hémoglobine







Figure A.22 | Transport transplacentaire du glucose à travers le syncytiotrophoblaste L'expression de GLUT1 croit avec l'avancement de la grossesse, conduisant à une forte expression à terme. A *contrario*, GLUT3 et GLUT4 sont plus exprimées en début de grossesse qu'à terme. En fin de grossesse, GLUT12 n'est plus exprimé dans le syncytiotrophoblaste. D'après (Sandovici*et al.* 2012).

GLUT (protéine) traduite du gène SLC2A : Solute Carrier Family ou Transporteur de Glucose.

fœtale n'est cependant pas présente chez le lapin, le cheval, le chien et la souris (Tarrade *et al.* 2014a).

3.3.2. Transfert du glucose

Le glucose est la principale source d'énergie du fœtus. La glycémie fœtale reste inférieure à la glycémie maternelle en y restant cependant directement corrélée (**Figure A.21**) (Pere 2003; Sandovici *et al.* 2012). Le transfert transplacentaire se fait par diffusion facilitée *via* des transporteurs de la famille des SLC (*Solute Carrier Family*). Le transport de glucose à travers le placenta humain est saturable lors de fortes concentrations maternelles et fœtales, stéréo-spécifique et indépendant de toute source d'énergie (**Figure A.22**) (Desforges & Sibley 2010).

Les profils d'expression des transporteurs du glucose évoluent au cours de la grossesse chez la femme, *SLC2A1* (*Solute Carrier family 2 member 1*, codant pour GLUT1) possède une expression croissante contrairement à *SLC2A3* (*Solute Carrier family 2 member 3*, codant pour GLUT3) et aux isoformes *SLC2A4* (*Solute Carrier family 2 member 4*, codant pour GLUT4) et *SLC2A12* (*Solute Carrier family 2 member 12*, codant pour GLUT12) qui voient leur expression fortement diminuer (Lager & Powell 2012). A terme, *SLC2A12* n'est plus exprimé dans le syncytiotrophoblaste mais seulement dans les cellules stromales et les cellules musculaires lisses vasculaires (Gude et al. 2003). Il existe d'autres isoformes *SLC2A9* (*Solute Carrier family 2 member 9*, codant pour GLUT9). Ce transporteur possède deux variants *SLC2A9a* et *SLC2A9b* et serait spécialisé dans le transport de fructose à travers le placenta (Bibee *et al.* 2011). Le premier variant GLUT9a est plus exprimé sur la membrane basale des cellules du syncytiotrophoblaste alors que GLUT9b est largement exprimé sur la membrane des microvillosités (Bibee *et al.* 2011).

Chez le lapin, l'expression génique de *SLC2A1* augmente de G13 à G18 alors que celle de *SLC2A3* diminue pendant cette même période (Khan *et al.* 2011), suivant donc les mêmes profils que chez l'homme.

Chez l'homme, le transport placentaire de glucose est principalement réalisé par le transporteur GLUT1, présent sur la membrane du syncytiotrophoblaste du côté maternel et sur la membrane basale côté fœtal ainsi que sur les membranes du cytotrophoblaste et



Figure A.23 | Voie de signalisation mTOR

Les deux complexes de mTOR seraient impliqués dans l'activation du transfert transplacentaire des nutriments. D'après (Roos *et al.* 2009)(Dimasuay *et al.* 2016). mTORC1 : mammalian Target of Rapamycin Complex 1 ; mTORC2 : mammalian Target of Rapamycin Complex 2. le transporteur GLUT3, exprimé seulement sur la membrane des microvillosités (Larque *et al.* 2013; Tarrade *et al.* 2014a). La distribution asymétrique de GLUT1 sur les membranes des cellules trophoblastiques est proposée comme une étape de ralentissement de la vitesse de transport du glucose à travers le placenta, qui permet de maintenir le gradient de concentration de glucose entre le sang maternel et fœtal (Illsley 2000; Larque *et al.* 2013). Chez les rongeurs, la protéine GLUT1 est exprimée sur toutes les membranes (côté maternel et membrane basale) du syncytiotrophoblaste alors que GLUT3 est localisé spécifiquement sur la surface maternelle du trophoblaste (Takata *et al.* 1994; Shin *et al.* 1997). Il n'y aucune expression de ces transporteurs sur les membranes de la couche cytotrophoblastique (Shin *et al.* 1997). Chez le lapin, GLUT1 est principalement exprimé à la surface des cellules syncytiotrophoblastiques, alors que GLUT 3 est exprimé sur les membranes basales des cellules cytotrophoblastiques ainsi qu'au niveau des vaisseaux fœtaux (Khan *et al.* 2011).

Les transporteurs GLUT4 (exprimé dans les cellules stromales) et GLUT12 sont dépendants de l'insuline, contrairement à GLUT1 et GLUT3. L'insuline ne traverse pas le placenta. L'insuline maternelle a donc peu d'effet direct sur la régulation des transporteurs placentaires de glucose, elle interfère néanmoins via le contrôle de la glycémie maternelle, le transport du glucose à travers le placenta se faisant grâce à un gradient. On observe cependant que le récepteur à l'insuline, qui est exprimé dans le placenta, active la voie de signalisation de mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), désigné comme un « senseur des nutriments ». mTOR est un activateur des transporteurs d'acides aminés et stimule la prolifération cellulaire et la croissance (**Figure A.23**) (Larque *et al.* 2013). mTOR est essentiel pour le développement précoce et la prolifération cellulaire (Roos *et al.* 2009b). Ce facteur activerait les systèmes L et A du transport des acides aminés (voir § 3.3.3) (Roos *et al.* 2007).

En conclusion de ce paragraphe, le transfert de glucose est essentiel au cours du développement et une dérégulation de l'expression des transporteurs du glucose a été rapportée en cas de problèmes de croissance fœtale (voir § 3.5.3).

3.3.3. Transfert des acides aminés

La taille des protéines est le facteur limitant leur transfert à travers le placenta. En revanche, les acides aminés libres sont transférés au fœtus par le biais de nombreux



Figure A.24 | Principaux transporteurs transplacentaires des acides aminés au niveau du syncytiotrophoblaste

SNAT1-4 (protéines) associées aux gènes SLC38A1-4 : Transporteurs d'acides aminés neutres ; LAT1 : L-type Amino acid Transporter ou Transporteur des acides aminés neutres, des acides aminés à branches ramifiées et du tryptophane ; Na⁺ : Ion Sodium ; TAT1 (SLC16A10) : Transporteurs des acides aminés aromatiques ; ASCT1/2 (Alanine, Sérine, Cystéine): Transport des acides aminés neutres.

transporteurs spécifiques. Des dérégulations du transfert des acides aminés sont associées à des retards de croissance chez l'homme (voir **§ 3.5.3**) (Larque *et al.* 2013).

La concentration en acides aminés libres dans le placenta est largement supérieure à celle dans la circulation maternelle ou fœtale, indiquant un rôle majeur du placenta dans le transfert des acides aminés (Larque *et al.* 2013). Le transport des acides aminés à travers les cellules syncytiotrophoblastiques se fait par transport actif car il nécessite de l'énergie pour aller contre le gradient de concentration, plus élevée dans le sang fœtal que dans le sang maternel (**Figure A.24**) (Desforges & Sibley 2010). Il existe deux catégories de transporteurs : les co-transporteurs d'acides aminés avec des ions Na⁺ (système Na⁺-dépendant) et ceux qui sont indépendants de ce mécanisme de cotransport (système Na⁺-indépendant). Les transporteurs Na⁺-dépendants n'utilisent pas directement l'ATP, ils profitent d'une ATPase Na⁺/K⁺ qui crée un gradient de Na⁺ (Desforges & Sibley 2010). L'énergie produite par le gradient de Na⁺ est utilisée pour le transport des acides aminés contre leur gradient de concentration. La stœchiométrie Na⁺:acide aminé est de 1:1. Les transporteurs sont aussi classés en fonction du type d'acide aminé qu'ils transportent : cationique, zwitterionique (forme neutre possédant autant de charges positives que de charges négatives) ou anionique.

Les acides aminés sont transférés à travers le placenta via un transport actif par un système complexe comprenant plus de dix familles de transporteurs d'acides aminés : A, L, y+, y+L, T, X_{AG} et ASC (**Tableau A.7**) (Cleal & Lewis 2008; Avagliano *et al.* 2012). Ces transporteurs sont subdivisés en deux classes : les transporteurs d'acide aminés accumulateurs (système A et X_{AG}) et les transporteurs échangeurs (LAT1, LAT2, y+LAT1, y+LAT2 et ASC) (Cleal & Lewis 2008). Les transporteurs accumulateurs contrôlent le transfert direct d'acides aminés spécifiques dans le syncytiotrophoblaste. L'autre catégorie de transporteurs échange un acide aminé du syncytiotrophoblaste contre un acide aminé de la circulation maternelle ou fœtale. Les acides aminés essentiels, c'est-à-dire non synthétisés *de novo* dans l'organisme, sont transportés par les systèmes B^o, b^{o,+}, L, y⁺L, y⁺, b⁰⁺ et N (**Tableau A.8**).

Les gènes codant les différents transporteurs sont divisés en plusieurs familles de SLC (Solute Carrier). Par exemple, la famille des gènes *SLC*38 code pour les transporteurs des systèmes A et L (Hediger *et al.* 2004).

Système de transport	Mécanisme	Protéine	Localisation	Substrat	
Les systèmes dépendants de Na ⁺					
А	ACC	SLC38A1,2,4	MMV, MB	Acides aminés neutres	
ASC	EC	ASCT1,2	MB	Acides aminés neutres	
β		TAUT	MMV, BM	Taurine	
Ν		SN1	MMV (contesté chez l'humain)	Histidine, asparagine, glutamine	
X ⁻ AG	ACC/EC	EAAT1-4	MMV, BM	Acides aminés anioniques	
GLY		GLYT1	MMV	Glycine et sarcosine	
B ^{0,+}		ATB ^{0,+}	?	Acides aminés cationiques et neutres	
Les systèmes indépendants à Na ⁺					
L	EC/EF	LAT1,2,4/4F2hc	MMV, MB	Acides aminés neutres, à chaîne ramifiée et tryptophane	
У+	Monoport	CAT1,4	MMV, MB	Acides aminés cationiques	
y*L	EC	y ⁺ LAT1/4F2hc	MMV, MB	Acides aminés cationiques (Acides aminés neutres en présence de sodium)	
b ^{0,+}	EC	rBAT	MB	Acides aminés cationiques et neutres	
Т	EF	TAT1	MB	Acides aminés aromatiques	
Asc	EC	Asc1/4F2hc	MB?	Petits acides aminés neutres et D- sérine	

Tableau A.7 | Systèmes de transport des acides aminés dans le placenta humain

ACC : Accumulatif ; EC : Echange ; EF : Efflux ; MMV : Membrane des microVillosités ; MB : Membrane basale. D'après (Larque *et al.* 2013).

Acides aminés essentiels	Transporteurs placentaires (Sytème)	
Phénylalaline (Tyrosine)	LAT-1 et -2 (L)	
Leucine	ATB^o (B^o), (b ^{o,+}), LAT-1 et -2 (L)	
Méthionine (cystéine)	LAT-1 et -2 (L)	
Lysine	y+LAT-1 et -2 (y+L), CAT-1, -2B et - 4 (y+) (b ⁰⁺)	
Isoleucine	LAT-1 et -2 (L), ATB^o (B^o)	
Valine	LAT-1 et -2 (L), ATB^o (B^o)	
Thréonine	ATBº (Bº)	
Tryptophane	LAT-1 et -2 (L)	
Histidine	(N)	

Tableau A.8 | Transfert placentaire des acides aminés essentiels

Les transporteurs qui apparaissent en gras sont les transporteurs dépendants du Na⁺.

Les acides aminés essentiels ne sont pas synthétisés *de novo* dans l'organisme, ils doivent donc être apportés par des voies externes comme l'alimentation.



Figure A.25 | Transport transplacentaire des acides gras à travers le syncytiotrophoblaste

LDL : Low Density Lipoprotein ; VLDL : Very Low Density Lipoprotein ; R-LPL : Récepteurs des lipoprotéines couplés à la LPL (Lipoprotéine lipase) ; AGNE : Acides Gras Non Estérifiés ; FAT/CD36 : Fatty Acid Translocase ; FATPs : Fatty Acid Transport Proteins ; FABP : Fatty Acid Binding Protein (L- : Liver type ; H- : Heart type) ; pFABPpm : placental plasma membrane FABP. D'après (Duttaroy 2000)(Duttaroy 2009).

Chez le rat, en conditions normales, *SLC*38A1 et *SLC*38A2 ont une expression génique qui augmente de façon linéaire entre 15 jpc et 21 jpc, *SLC*38A4 est exprimé à 18 jpc (Jansson *et al.* 2006; Reynolds *et al.* 2015). Chez la souris, *SLC*38A1, *SLC*38A2 et *SLC*38A4 sont expimés à 16 jpc et 19 jpc en conditions contrôles (Coan *et al.* 2008; Sferruzzi-Perri *et al.* 2013).

Chez le lapin, l'expression génique des transporteurs *SLC*38A1, *SLC*38A2 et *SLC*38A4 a été mis en évidence dans des conditions normales (Tarrade *et al.* 2013).

mTOR est un régulateur positif des systèmes de transports des acides aminés A et L, son activité est inhibée dans les placentas RCIU. L'insuline, l'oxygène et la concentration en acides aminés peuvent moduler la voie de signalisation mTOR dans le placenta humain (**Figure A.23**) (Roos *et al.* 2009a).

En conclusion, le placenta a une capacité d'utilisation, de production et de conversion des acides aminés. Ce métabolisme placentaire des acides aminés peut réellement moduler la quantité d'acides aminés délivrée dans la circulation fœtale (Regnault *et al.* 2002).

3.3.4. Transfert des acides gras

Les acides gras essentiels (acide linoléique et acide α-linolénique) et les acides gras polyinsaturés à longues chaînes sont indispensables à la croissance fœtale, en particulier pour la croissance du cerveau. Ils doivent donc être transférés de la circulation maternelle vers la circulation fœtale avec une augmentation du transfert transplacentaire des acides gras au cours de la grossesse (Duttaroy 2009; Larque *et al.* 2013; Herrera & Ortega-Senovilla 2014). Le transfert d'acides gras à travers le placenta humain est relativement élevé au dernier trimestre lors du développement du cerveau (Herrera & Ortega-Senovilla 2014). Les acides gras préférentiellement transférés par le placenta sont les acides gras polyinsaturés à longue chaîne et plus particulièrement les acides gras essentiels pour la croissance du cerveau en fin de grossesse (**Figure A.25**). Le fœtus peut aussi synthétiser quelques acides gras saturés et monoinsaturés à partir du glucose.

Chez l'homme, les lipoprotéines présentes dans la circulation maternelle ne peuvent pas directement traverser le placenta, cependant les acides gras qu'elles contiennent doivent être disponibles pour le fœtus (Herrera & Ortega-Senovilla 2014). Le placenta exprime des récepteurs membranaires pour toutes les lipoprotéines circulant

dans le plasma maternel, associés à différentes lipases telles que la LPL (lipoprotéine lipase), la lipase endothéliale, la phospholipase A2 et la lipase intracellulaire ainsi qu'un grand nombre de protéines de liaison (FABP) (Varastehpour *et al.* 2006; Koletzko *et al.* 2007). Les transporteurs membranaires des acides gras sont : FABPpm (*Fatty Acid Binding Protein plasma membrane*), p-FABPpm (*placental plasma membrane Fatty Acid Binding Protein*), FAT (FAT/CD36, *Fatty Acid Translocase*) et FATP-1, -4 et -6 (Fatty *Acid Transport Proteins*). Seule la p-FABPpm semble est exclusivement exprimée dans le placenta.

La protéine p-FABPpm est une protéine membranaire exprimée exclusivement sur la couche externe de la membrane phospholipidique et uniquement sur la membrane des microvillosités (Stump *et al.* 1993; Campbell & Duttaroy 1995; Campbell *et al.* 1995). Chez la femme, au cours du dernier trimestre de grossesse, p-FABPpm ne transporte que 15% de la totalité des acides gras (Duttaroy 2009). La protéine p-FABPpm a une affinité supérieure pour les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) par rapport aux autres acides gras. Elle se lie préférentiellement à l'acide arachidonique et au DHA, plutôt qu'aux acides oléique et linoléique (Campbell *et al.* 1998b). La présence de cette protéine du côté de la circulation maternelle pourrait renforcer le flux unidirectionnel des AGPI-LC de la mère vers le fœtus.

La protéine FAT/CD36, une translocase d'acides gras, est une protéine membranaire. Cette protéine, comparée aux autres transporteurs d'acides gras, comporte de nombreux substrats comme les acides gras libres, le collagène, les thrombospondines et les LDL (*Low density Lipoprotein*) oxydés (Duttaroy 2009). La protéine FAT/CD36 est exprimée sur la membrane des microvillosités et sur la membrane basale. Elle permettrait la translocation des acides gras à longues chaînes vers la cellule trophoblastique.

Les autres protéines pouvant transporter les acides gras à longue chaîne sont les FATP. La famille des FATP comporte 6 membres ayant des profils d'expression différents selon les tissus (Duttaroy 2009). Les protéines FATP1 et 4 ont des expressions très élevées dans le placenta (Larque *et al.* 2006).

Dans le cytoplasme, les acides gras sont transportés par d'autres protéines, les FABP (*Fatty Acid Binding Protein*), dont il existe plusieurs formes (Duttaroy 2009). Dans le placenta humain, H-FABP (Heart-FABP) et L-FABP (Liver-FABP) ont une expression trophoblastique inférieure à FATP1 et FATP4 (Campbell *et al.* 1998a; Larque *et al.* 2006).



Figure A.26 | Transport transplacentaire du fer à travers le syncytiotrophoblaste

Dans le sang maternel, le fer se lie à la transferrine (TF) circulante, puis ce complexe se fixe au récepteur de la transferrine (TFRC) présent sur la membrane des microvillosités du syncytiotrophoblaste. Ce complexe est internalisé par endocytose à dathrine (McArdle *et al.* 2003)(Gambling *et al.* 2011) et le fer est libéré dans l'endosome grâce une diminution du pH induite par une pompe à proton H⁺ (ATPase). Le fer est ensuite transporté en dehors de la vésicule par la protéine DMT1 (Divalent Metal Transporter 1). Le mécanisme exact de transport du fer au sein du cytoplasme est encore inconnu à ce jour, il semblerait qu'il soit maintenu sous sa forme Fe²⁺ pour éviter d'être impliqué dans des réactions chimiques (Gambling *et al.* 2011). La protéine IREG1 (Iron-Regulated Protein 1 ou ferroportine) permet le passage du fer à travers la membrane basale jusqu'à la circulation fœtale. La transferrine a une affinité plus élevée pour le Fe³⁺ par rapport au Fe²⁺. Une ferroxidase, nommé HEPHL1 est présente sur la membrane transmembranaire. Elle catalyse l'oxydation du Fe²⁺ en Fe³⁺ et permet sa prise en charge par la transferrine. Une fois lié à la transferrine dans la circulation fœtale, le fer peut atteindre les organes fœtaux ou les cellules stromales.

La clathrine est représentée par les hexagones vert foncé proche du TFRC.

TF : Transferrine ; Fe^{3+}/Fe^{2+} : lons fer ; TFRC : Récepteur à la Transferrine ; DMT1 : Divalent Metal Transporter 1 ; IREG1 : Iron-Regulated Protein 1 ou Ferroportine ; HEPHL1 : Ferroxidase. FATP1 et 4 seraient essentielles au transport et au métabolisme des acides gras dans les cellules trophoblastiques. Une fois dans le cytoplasme, les acides gras liés aux FABP interagissent avec les organites tels que le réticulum endoplasmique, les mitochondries, les gouttelettes lipidiques et les peroxisomes pour entrer dans différentes voies de signalisation (**Figure A.25**) (Duttaroy 2000, 2009; Larque *et al.* 2013).

Chez le rat, il a été montré que hFABP était exprimé préférentiellement dans la zone labyrinthique et que son expression augmente pendant la deuxième moitié de la gestation, suggérant un besoin en acides gras croissant avec l'avancement de la gestation. FABPpm, FAT et FATP sont exprimés dans la zone labyrinthique et dans la zone jonctionnelle, avec FAT principalement localisé dans le labyrinthe (Knipp *et al.* 2000).

Dans notre espèce d'intérêt, le lapin, des études des années 1970 ont permis de mettre en évidence le transfert d'acides gras libres dans des placentas de lapin à 28 jpc et que ce transport était dépendant des concentrations maternelles et du besoin fœtal (Elphick *et al.* 1975; Elphick & Hull 1977). Plus récemment, une expression génique placentaire des gènes FATP-4 et FAT/CD36 a été observée en conditions contrôles (Tarrade *et al.* 2013).

3.3.5. Transfert du fer

L'endocytose est un mécanisme permettant l'entrée de molécules particulières comme les immunoglobulines ou le fer dans le placenta par le biais de l'invagination de la membrane plasmique apicale formant de vésicules, avec relargage de la molécule au niveau cytoplasmique ou de la membrane basale cellulaire. Il existe différents types d'endocytose dont l'endocytose à clathrine, suggérée comme mécanisme d'entrée du fer dans la cellule placentaire. Nous avons choisi de présenter les connaissances actuelles sur le mécanisme de transfert du fer de la circulation maternelle à la circulation fœtale en raison des hypothèses développées dans la suite de ces travaux.

Le fer est essentiel pour de nombreux processus biologiques comme le transfert de l'oxygène dans le sang, mais il peut aussi être toxique. Son transport doit donc être très bien contrôlé pour maintenir la santé de l'individu. Pendant la grossesse, le fer est transporté, de façon unidirectionnelle, de la circulation maternelle au sang fœtal en traversant le placenta, pour les besoins du fœtus en développement (**Figure A.26**) (Bastin *et al.* 2006). Dans le sang maternel, le fer se lie à la transferrine (TF) circulante puis ce

complexe vient se fixer au récepteur de la transferrine (TFRC) exprimé sur la membrane des microvillosités du syncytiotrophoblaste. Ce complexe est ensuite internalisé par endocytose à clathrine (McArdle et al. 2003; Gambling et al. 2011) et le fer est libéré dans l'endosome grâce une diminution du pH induite par une pompe à proton H⁺ (ATPase). Le fer est ensuite transporté en dehors de la vésicule par la protéine DMT1 (Divalent Metal Transporter 1). Le mécanisme exact de transport du fer au sein du cytoplasme est encore inconnu à ce jour, il semblerait qu'il soit maintenu sous sa forme Fe²⁺ pour éviter qu'il soit impliqué dans des réactions chimiques (Gambling et al. 2011). La protéine IREG1 (Iron-Regulated Protein 1 ou ferroportine) permet le passage du fer à travers la membrane basale jusqu'à la circulation fœtale. La transferrine a une affinité plus élevée pour le Fe³⁺ par rapport au Fe²⁺. Sur la membrane transmembranaire est exprimée une ferroxidase, nommé HEPHL1 (Hephaestin Like 1), catalysant l'oxydation du Fe²⁺ vers le Fe³⁺ afin de permettre sa prise en charge par la transferrine. Une fois lié à la transferrine, dans la circulation fœtale, le fer peut ensuite atteindre les organes fœtaux ou les cellules stromales (Bastin et al. 2006). Chez la femme, il existe une corrélation inverse entre les expressions génique et protéique de TFRC et le statut en fer de la mère. C'est-à-dire que plus les taux maternels circulants en fer sont faibles, plus le placenta exprime le récepteur à la transferrine (Garcia-Valdes et al. 2015).

3.4. Fonction endocrine placentaire

La production de différentes hormones au cours de la gestation est une autre des fonctions majeures exercées par le placenta. Ces hormones sont importantes pour la mise en place et le maintien de la gestation. Elles ont des effets autocrine et paracrine qui régulent l'implantation embryonnaire au sein de l'endomètre, le développement placentaire, l'angiogenèse, l'immunotolérance et le développement fœtal. Les hormones placentaires sont majoritairement produites par le syncytiotrophoblaste, leur production est finement régulée (Costa 2016). La synthèse et la fonction des hormones varient de façon considérable entre les espèces. Le placenta exprime un grand nombre d'hormones stéroïdes et polypeptidiques (Cross 2016), c'est pourquoi pour des soucis de clarté seules quelques-unes de ces hormones seront décrites dans le paragraphe ci-après.

3.4.1. Les hormones stéroïdes

La progestérone (P4) est une hormone stéroïde cruciale pour le maintien de la grossesse. C'est l'hormone la plus partagée dans le monde animal. La principale source de P4 au début de la grossesse est le corps jaune jusqu'à ce que le placenta prenne le relais à partir de 6-8 semaines de grossesse chez l'humain. Elle est synthétisée dans les mitochondries des cellules du syncytiotrophoblaste à partir du cholestérol maternel (Martinez *et al.* 2015). La P4 exerce des actions génomiques et non génomiques grâce à différents récepteurs et agit souvent en synergie avec d'autres hormones. Ses principales fonctions sont exercées au sein de l'utérus, comme par exemple de favoriser l'implantation embryonnaire *via* des actions génomiques (Halasz & Szekeres-Bartho 2013), de permettre l'inhibition de la contractilité du myomètre permettant une quiescence utérine tout au long de la grossesse, ou encore de jouer un rôle dans la régulation de la fonction endocrine placentaire. Cette hormone permet aussi la préparation de la glande mammaire pour la lactation en induisant la prolifération de l'épithélium mammaire.

Parmi les œstrogènes placentaires, l'œstradiol (E2) est le plus abondant au cours de la grossesse. Il intervient dans l'implantation embryonnaire en stimulant la différenciation et la croissance des cellules endométriales (Groothuis *et al.* 2007). L'E2 stimule aussi l'angiogenèse et la vasodilatation, ce qui indique un rôle dans la régulation du flux sanguin utéro-placentaire chez l'homme (Corcoran *et al.* 2014). Il augmente la contraction des cellules du myomètre chez l'homme, suggérant un rôle dans l'initiation de l'accouchement (Di *et al.* 2001). L'E2 agit en synergie avec la progestérone, le ratio P4/E2 joue un rôle important dans l'implantation en début de grossesse et pour les contractions des cellules du myomètre plus tard dans la gestation. En plus de toutes ces fonctions locales, il stimule la prolifération de l'épithélium mammaire (Pang & Hartmann 2007). L'E2 est aussi impliqué dans les altérations métaboliques au cours de la grossesse, en inhibant la lipolyse et en activant l'hyperlipidémie et le stockage des graisses chez la mère (Butte 2000).

Les glucocorticoïdes, qui sont des corticostéroïdes, possèdent un rôle de maturation au cours du développement fœtal. Pour cela, ils induisent des changements dans l'expression cellulaire de protéines de structure, de transport ou encore de signalisation. Proche du terme, leur action est primordiale dans la maturation finale du fœtus en activant les systèmes physiologiques responsables des fonctions respiratoires,

nutritives et excrétoires qui permettent la vie extra-utérine (Fowden & Forhead 2015). Le placenta possède un rôle protecteur du fœtus face au cortisol maternel, par le biais de l'enzyme 11HSD β_2 (11 β -hydroxysteroid deshydrogenase type 2) qui catalyse la transformation du cortisol en cortisone protégeant ainsi le fœtus d'une exposition trop précoce à ce facteur de maturation lors de son développement.

Le placenta de lapin ne produit ni progestérone, ni œstrogènes (Martensson 1984). La gestation est donc maintenue par la sécrétion continue de progestérone par le corps jaune (Miller 1998).

3.4.2. Les hormones polypeptidiques

Chez l'homme, l'hCG (human Chorionic Gonadotrophin) est une glycoprotéine dont la production commence avant l'implantation (état 6-8 cellules) (Bonduelle *et al.* 1988). Cette hormone exerce un certain nombre de fonctions au cours du développement fœtoplacentaire, comme un rôle de modulateur de l'angiogenèse de l'endomètre et du placenta. Elle est importante pour la tolérance immunitaire en jouant un rôle d'immunosuppresseur au cours de la grossesse. L'invasion trophoblastique est stimulée par l'hCG, en modulant la production des métalloprotéases matricielles et de leurs inhibiteurs. L'hCG active la réceptivité de l'endomètre et joue donc un rôle majeur dans l'implantation de l'embryon (d'Hauterive *et al.* 2007). De plus, elle stimule la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes.

L'hormone lactogène placentaire est biosynthétisée majoritairement par le syncytiotrophoblaste. La fonction principale de cette hormone est la régulation des métabolismes des lipides et des glucides qui sont indispensables à l'homéostasie énergétique maternelle et fœtale. Au sein de la glande mammaire, l'hormone lactogène placentaire possède une fonction mammogène (activation de la synthèse d'ADN dans le tissu mammaire) et une fonction lactogène (Costa 2016).

La leptine a été la première adipokine à être identifiée. C'est une hormone peptidique, codée par le gène Ob. La leptine est principalement sécrétée par les adipocytes dans la circulation sanguine, elle possède un rôle important dans la régulation du poids corporel, de l'appétit et de l'homéostasie énergétique. Ses concentrations plasmatiques sont corrélées à l'adiposité de l'individu. De plus, cette adipokine est exprimée dans plusieurs autres tissus et organes où elle a différentes fonctions, dont un



FOETUS

Figure A.27 | Facteurs de croissance – IGFs dans le syncytiotrophoblaste

IGF-1 et IGF-2 peuvent se fixer sur le récepteur IGF-1R, permettant l'activation des voies de signalisation PI3K et MAPK permettant la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. La voie de signalisation du récepteur IGF-2R permet la régulation des effets de l'IGF-2.

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1 ; IGF-2 : Insulin-like Growth factor 2 ; IGF-1R : Récepteur à IGF-1 ; IGF-2R : Récepteur à IGF-2 ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase.

rôle dans l'angiogenèse, la fonction immunitaire et le métabolisme osseux (Park & Ahima 2015). Pendant la grossesse, le placenta humain synthétise de grandes quantités de leptine, qui est libérée dans la circulation maternelle (95%) et fœtale (5%) (Schubring *et al.* 1997; Lepercq *et al.* 2007). La principale source de leptine est le syncytiotrophoblaste (Senaris *et al.* 1997). De plus, la synthèse placentaire de leptine est plus élevée en début de grossesse qu'à terme (Henson *et al.* 1998). Dans le placenta humain, la leptine intervient dans la prolifération du cytotrophoblaste, dans l'invasion trophoblastique, dans l'angiogenèse et régule la production hormonale (hCG, P4 et E2) (Costa 2016).

Les IGF (Insulin-like Growth Factors), IGF-1 et IGF-2, sont des facteurs de croissance possédant une chaîne très homologue, structurellement très proches de la pro-insuline. IGF-1 se lie à l'IGF-1R (récepteur de l'IGF1, de structure très proche de celle du récepteur à l'insuline) et IGF-2 se lie à l'IGF-1R ou à l'IGF-2R. IGF-1R et le récepteur à l'insuline sont des récepteurs membranaires liés à la tyrosine kinase (Figure A.27) (Bowman et al. 2010). IGF-1R est exprimé sur tous les types cellulaires placentaires, incluant les cellules trophoblastiques et le mésenchyme. IGF-2R est exprimé sur la membrane des microvillosités et la membrane basale des cellules trophoblastiques. IGF-2R possède un rôle de régulation de la concentration en IGF-2 en protégeant le fœtus des effets d'une concentration trop élevée (Forbes & Westwood 2008). Une fois lié à l'IGF-2, ce récepteur peut être internalisé et clivé, entrainant la dégradation de l'IGF-2 en bloquant ces actions cellulaires (Forbes & Westwood 2008). Ces facteurs de croissance sont transportés dans l'organisme via les IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein). Chez la femme, en début de grossesse, IGF-1 est exprimé dans le cytotrophoblaste et le trophoblaste extravilleux. IGF-2 est exprimé dans le chorion, le cytotrophoblaste, le trophoblaste extravilleux et l'amnios (Forbes & Westwood 2008). Chez la souris, à 10,5 jpc, IGF-2 est exprimé dans le mésoderme et les vaisseaux fœtaux ainsi que dans le spongiotrophoblaste (Carter et al. 2006). Les modèles murins de KO (« Knock-Out » qui correspond à l'inactivation totale d'un gène) du transcrit placentaire d'IGF-2 ont mis en évidence que le facteur de croissance IGF-2 était impliqué dans le contrôle du transfert de nutriments (Sibley et al. 2004; Constancia et al. 2005; Kusinski et al. 2011). L'axe des IGF joue un rôle majeur dans la croissance fœtale, le développement et la fonction placentaire (Forbes & Westwood 2008; Fowden & Forhead 2009). Chez l'homme, la voie des IGF, et plus particulièrement IGF-2, IGFBP1 et IGF-1R est impliquée dans l'invasion

trophoblastique et augmente le flux sanguin utéro-placentaire pendant l'implantation (Bowman *et al.* 2010).

En conclusion, la fonction endocrine du placenta est importante pour le maintien et le bon déroulement de la grossesse/gestation ainsi que dans la préparation à la parturition et à la lactation.

La première partie de ce chapitre a abordé les différents facteurs à l'origine des transferts transplacentaires de nutriments : la surface d'échanges, les flux sanguins, les transporteurs, les hormones. Les adaptations placentaires à l'environnement placentaire, décrites par la suite, ont lieu par le biais de modifications d'une ou plusieurs de ces fonctions.

3.5. Plasticité placentaire en réponse à l'environnement maternel

Le placenta, sensible à l'environnement maternel, influence la croissance fœtale directement et indirectement en modifiant la répartition des nutriments entre la mère et le fœtus ainsi que les métabolismes maternel et fœtal (Fowden & Forhead 2009). A l'interface entre la mère et le fœtus, le placenta agit comme un « senseur » de l'environnement fœto-maternel *et* s'adapte aux facteurs intrinsèques et extrinsèques. Ces adaptations placentaires destinées à favoriser la survie à court terme du fœtus, principalement en protégeant le cerveau de façon prioritaire, peuvent avoir des conséquences à plus long terme au cours de la vie post-natale (**Figure A.10**) (Gluckman *et al.* 2008). Leur nature dépend du type de facteurs (intrinsèque ou extrinsèque), du degré d'exposition à cet environnement, du temps et de la fenêtre d'exposition, mais aussi du sexe du fœtus, rendant les études difficilement comparables. Toutes les dérégulations et adaptations placentaires décrites par la suite sont généralement associées à des modifications des poids fœtaux et placentaires.

Pour des soucis de clarté, nous nous baserons sur quelques exemples illustrant des adaptations placentaires en lien avec la morphologie et les fonctions placentaires de transport et endocrine.

3.5.1. Adaptations morphologiques

Dans plusieurs espèces, il a été démontré que beaucoup de facteurs environnementaux pouvaient modifier la morphologie et l'ultrastructure placentaire.

Dans des modèles rongeurs, une sous-nutrition maternelle au cours de la gestation entraine une réduction du volume des vaisseaux fœtaux, de l'espace sanguin maternel et de la zone labyrinthique ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de la barrière interhémale, définie par l'épaisseur des couches cellulaires séparant le sang maternel du sang fœtal (Roberts *et al.* 2001; Coan *et al.* 2010). Une hypoxie maternelle induit l'augmentation du volume des vaisseaux fœtaux et réduit l'épaisseur de la barrière interhémale chez l'homme et le cochon d'inde (Bacon *et al.* 1984; Reshetnikova *et al.* 1994).

Le poids placentaire est directement lié à la surface d'échanges, responsable des transferts de nutriments et autres composants indispensables à la croissance du fœtus. Un changement de poids placentaire correspondrait à une réponse adaptative globale ayant pour but le maintien ou l'augmentation des ressources apportées au fœtus. La conséquence directe de cette modification de poids placentaire est l'augmentation, dans la majorité des cas, ou la diminution de l'efficacité placentaire, qui est définie par le rapport entre le poids fœtal et le poids placentaire et qui correspond au nombre de grammes de fœtus produits par gramme de placenta.

3.5.2. Adaptations vasculaires

Les échanges transplacentaires dépendent des flux sanguins placentaires, qui dépendent de la vascularisation du placenta. Frias et *al.*, ont démontré qu'une surnutrition maternelle avant et pendant la gestation entrainait, chez les primates non humains, une réduction du flux sanguin utérin et en cas d'obésité et d'insulino-résistance maternelle, une réduction du flux placentaire (Frias *et al.* 2011). Dans un modèle mouton, une surnutrition maternelle pendant la gestation, en début de gestation, réduit le développement vasculaire dans les cotylédons fœtaux (Redmer *et al.* 2009) et les flux sanguins utérins et utéro-placentaires en milieu et fin de gestation (Wallace *et al.* 2002; Wallace *et al.* 2008). Ces résultats s'accompagnent d'une expression moins élevée des facteurs angiogéniques VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), PIGF (Placental Growth Factor 2), ANG-1 (Angiopoïétine 1), ANG-2
(Angiopoïétine 2), chez les brebis obèses par rapport aux contrôles pendant la 2^{ème} moitié de la gestation. L'augmentation du diamètre des artérioles pourrait accélérer la croissance fœtale alors que la réduction de l'expression des facteurs angiogéniques limiterait la vascularisation placentaire et donc la croissance fœtale (Ma *et al.* 2010).

3.5.3. Adaptations fonctionnelles

Les adaptations morphologiques et vasculaires du placenta ne peuvent expliquer entièrement les changements dans la capacité de transport transplacentaire qui sont observés en cas d'exposition à certains facteurs environnementaux. En cas de sousnutrition maternelle totale ou seulement en protéines, l'expression génique ou protéique de certains transporteurs des acides aminés et du glucose est modulée. Pour le transport des acides aminés, une sous-nutrition maternelle entraine chez le babouin et le rat une diminution de l'expression de SNAT2, LAT1 et LAT2 (Jansson et al. 2006; Rosario et al. 2011; Kavitha et al. 2014). De plus, les concentrations maternelles et fœtales en acides aminés ainsi que leur transfert transplacentaire sont diminués (Jansson et al. 2006; Rosario et al. 2011; Kavitha et al. 2014). Cette diminution de l'expression des transporteurs pourrait être expliquée par une inhibition des voies de l'insuline et mTOR qui régulent le transport des acides aminés (Kavitha et al. 2014). Chez la souris, un régime hypoprotéique entraine la mise en place d'adaptations placentaires pour la survie du fœtus avec une augmentation de l'expression génique de SLC2A1 ainsi que du transfert du glucose (Coan et al. 2011). Lors d'une exposition maternelle à un régime riche en calories, en lipides ou en cholestérol entrainant une obésité maternelle chez les rongeurs, l'expression protéique de GLUT1 et GLUT3 est augmentée dans le placenta induisant une augmentation du transfert de glucose vers le fœtus (Jones et al. 2009; Sferruzzi-Perri et al. 2013; Rosario et al. 2015). Ces adaptations fonctionnelles du transport du glucose peuvent être combinées à une augmentation de l'expression génique de SLC38A2 et LAT1, permettant ainsi le maintien d'une croissance fœtale optimale (Sferruzzi-Perri et al. 2013; Rosario et al. 2015). Lors d'une hypercholestérolémie maternelle chez la lapine, la translocation de la protéine GLUT1 vers la membrane cellulaire trophoblastique est diminuée, sans modification de son expression, entrainant tout de même une diminution du transfert du glucose au fœtus (Kevorkova et al. 2007).

En cas d'obésité maternelle, l'autre voie de transport de nutriments pouvant être affectée est celle des acides gras. Chez la femme en surpoids, une augmentation du transfert des acides gras a été démontrée et expliquée en partie par l'augmentation de l'expression de *FATP2* (Lager *et al.* 2016). Dans un modèle rat d'obésité maternelle, il existe une augmentation de l'expression du transporteur *FAT/CD36*, seulement chez les fœtus femelles (Reynolds *et al.* 2015). L'augmentation de la capacité de transport des acides gras pourrait être un phénomène d'adaptation permettant de préserver le développement du cerveau. Chez la lapine obèse, l'expression de *FAT/CD36* et *LDL-R*, impliqués dans la voie de transfert transplacentaire des acides gras, est diminuée (Tarrade *et al.* 2013).

Enfin, d'autres transporteurs peuvent être affectés. Par exemple, en cas d'anémie maternelle légère, chez la femme, il existe une augmentation de l'expression placentaire du TFRC. Curieusement, ce phénomène disparaît lorsque l'anémie plus est sévère (Li *et al.* 2008). Chez le rat, une anémie maternelle sévère entraine une augmentation de l'expression de la transferrine et de *DMT1*, activant ainsi le transfert transplacentaire de fer (Cornock *et al.* 2013).

3.5.4. Adaptations endocrines

Certaines adaptations morphologiques placentaires sont associées à des perturbations endocrines. Par exemple, chez la souris, un régime hypoprotéique entraine une diminution de l'épaisseur de la zone jonctionnelle, qui est riche en cellules endocrines, associée à une dérégulation de l'expression d'un gène de la famille des prolactines (Gonzalez *et al.* 2016). Chez la femme, en cas de RCIU causé par une sousnutrition calorique, une augmentation des concentrations plasmatiques de prolactine et d'hormone lactogène placentaire ainsi qu'une réduction de la concentration d'insuline sont observées dans le sang de la veine ombilicale (Mahajan *et al.* 2006). Cette augmentation de la concentration en hormone lactogène placentaire associée à l'hypoinsulinémie pourrait altérer les concentrations maternelles en facteurs de croissance (Mahajan *et al.* 2006). En cas d'obésité maternelle chez le rat, les concentrations plasmatiques en leptine maternelles et fœtales ainsi que les expressions géniques du récepteur à l'insuline et de la LPL sont augmentées alors que celle du récepteur à la leptine est diminuée dans les placentas du groupe obèse (Mazzucco *et al.*





Dans le but de maintenir la survie à court terme du fœtus, le placenta s'adapte *via* différentes voies : morphologique, vasculaire, fonctionnelle et endocrine, impliquant différents mécanismes physiologiques et épigénétiques.

mTOR : mammalian Target of Rapamycin ; PPARs : Peroxisome proliferator-activated receptors ; IGF2 : Insulin-like Growth Factor 2.

2013). L'augmentation de l'expression placentaire du récepteur à l'insuline et l'hyperinsulinémie fœtale pourraient activer le transport de glucose et d'acides aminés et moduler le flux placentaire, via la voie de signalisation mTOR (Figure A.23). Chez le rat, l'administration de la dexamethasone chez la mère entraine une dérégulation de l'expression des gènes de la famille des prolactines et de l'IGF-2 dans le placenta (Ain et al. 2005). De plus, le traitement à la dexaméthasone entraine une diminution significative de l'activation de la voie Akt (protéine kinase B), voie de signalisation des IGFs et qui prévient de l'apoptose dans la zone jonctionnelle, entrainant ainsi une augmentation des indices de l'apoptose (Ain et al. 2005). Chez la souris, une hypoxie maternelle entraine une augmentation de l'expression génique d'IGF-2 associée à une augmentation de l'expression protéique de l'Akt-S273-P, membre de la voie de signalisation Insuline/IGFs, ainsi que d'une réduction de l'expression protéique du récepteur à l'insuline, de l'IGF-1R et d'autres facteurs en amont de la voie de signalisation des IGFs dans la zone labyrinthique (Higgins et al. 2016). Chez la souris, lorsque les femelles gravides sont exposées à une restriction alimentaire, il existe une réduction de l'expression génique du transcrit placentaire de l'IGF-2 (Igf2Po) à G16 et à G19, induisant ainsi un retard de croissance associé à une diminution du poids placentaire (Coan et al. 2010).

Ainsi, le placenta s'adapte *via* différentes voies, morphologie, flux, transport des nutriments, fonction endocrine, afin d'essayer de maintenir une croissance fœtale optimale (**Figure A.28**). Ce type de changement dans le transfert transplacentaire de nutriments altère la croissance fœtale et pourra être associé, pour le fœtus, à l'augmentation du risque de développer des pathologies métaboliques à l'âge adulte.

A l'interface entre la mère et le fœtus, le placenta est un organe unique, autonome et transitoire. Grâce à ses multiples fonctions, comme le contrôle des échanges nutritionnels, sa fonction endocrine, son métabolisme ou sa fonction de protection immunitaire, le placenta permet une croissance fœtale optimale.

Grâce à son rôle d'interface, le placenta agit comme un senseur de l'environnement fœto-maternel en s'adaptant aux facteurs intrinsèques et extrinsèques, ce qui en fait l'agent principal de la programmation développementale. Ces adaptations sont d'ordre morphologiques, vasculaires, fonctionnelles ou encore endocrines. On parle d'agent programmateur car ces adaptations placentaires permettent la survie à court terme de l'individu.

4. Effets d'une exposition gestationnelle aux polluants atmosphériques et aux nanoparticules manufacturées sur la descendance

Le développement fœto-placentaire est sensible aux changements de l'environnement maternel (voir **A§3.5.**). Les facteurs environnementaux tels que l'alimentation, le stress ou la médication de la mère peuvent avoir des effets délétères sur le développement du fœtus. Dans ce chapitre, certains effets de l'exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique sur la croissance fœto-placentaire et sur la santé de la naissance à l'âge adulte sont décrits. Rappelons qu'actuellement, les femmes enceintes ne sont pas considérées comme population à risque en cas de pics de pollution (voir **A§2.**).

Pour faciliter la lecture de ce chapitre, les détails des cohortes et paramètres d'exposition pour les modèles animaux sont résumés dans différents tableaux. Ces tableaux sont insérés dans le manuscrit au moment de leur citation mais ils sont aussi présents sous forme détachés pour faciliter leur lecture en parallèle de ce chapitre.

4.1. Etudes épidémiologiques

Dans les études épidémiologiques, plusieurs marqueurs permettent d'évaluer le niveau d'exposition des femmes enceintes à la pollution atmosphérique (Encart A.2). Des modèles mathématiques combinant des données mesurées (e.g., concentrations pour un polluant donné et conditions météorologiques) et des données estimées (e.g., par des modèles de dispersion) sont utilisés pour cette évaluation (voir § 2.3.1). Plusieurs co-variables (e.g., sexe de l'enfant, âge gestationnel, âge de la mère, parité, lieu de résidence lorsqu'il n'est pas utilisé comme facteur d'estimation, saison, tabagisme, paramètres socio-économiques) peuvent être prises en compte dans les modèles statistiques afin d'évaluer de façon précise l'effet de l'exposition maternelle sur la santé de la femme enceinte et sa descendance. Elles varient selon les études.

Les **Tableaux A.9** et **A.10** décrivent en détail les cohortes utilisées pour analyser les effets d'une exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique sur la santé des femmes enceintes et de leur descendance.

Tableau A.9 | Etudes épidémiologiques – Effets sur la croissance fœto-placentaire

Référence	Slama <i>et al</i> 2013	Olsson et al 2015	Stieb <i>et al</i> 2016	Romao et al 2013	Candido da silva <i>et al</i> 2014	Slama <i>et al</i> 2009	Slama et al 2007	Fleisch et <i>al</i> 2015
Résultats	25% des femmes sont tombées enceintes au cours du premier mois sans protection. Chaque augmentation de 10 $\mu g/m_3$ de la concentration en PM _{3,5} est associée à une diminution de la fécondité de 22%. Les concentrations en NO ₂ sont aussi associées à une diminution de la fécondité. Pas de différence significative pour les autres polluants atmosphériques.	Association entre l'augmentation des concentrations en NOx et les troubles hypertensifs de la grossesse. Les 2 ^{ème} au 4 ^{ème} quartile de NOx sont associés à une augmentation du risque de PAG.	Association significative entre l'exposition au NO $_{23}$ ajustée sur la concentration en PM $_{2,5}$, et les PAG et les PPN.	Association mise en évidence entre les concentrations élevées en PM ₁₀ et une augmentation du risque de petits poids de naissance	Association mise en évidence entre les valeurs les plus élevées des concentrations en PM _{2,5} et NO ₂ et le risque de PPN au 2 ^{ème} trimestre et seulement avec les concentrations les plus élevées en PM _{2,5} au 3 ^{ème} trimestre.	Association mise en évidence entre une augmentation de la concentration en benzène et une diminution du poids de naissance et du périmètre crânien. Grâce aux échographies, les auteurs ont mis en évidence que l'exposition matemelle entraine une réduction du périmètre crânien fœtal en fin du deuxième trimestre et au troisième trimestre.	Association entre une augmentation de la concentration en PM ₃₅ et de leur absorbance et une augmentation du ratio de prévalence (= importance de la prévalence d'un évènement dans un groupes d'individus avec la caractéristique d'intérêt par rapport à un autre groupe n'ayant pas cette caractéristique) d'un poids de naissance inférieur à 3kg.	Association mise en évidence entre la proximité d'un trafic routier dense et un plus petit poids de naissance, une croissance post-natale accélérée et possèdent un poids-pour-longueur plus élevé à 6 mois. Les auteurs ont mis en évidence les mêmes associations pour cette proximité du trafic routier et pour une exposition au carbone suie au 3 ^{eme} trimestre, l'association entre la croissance fœtale et post-natale précoce avec une exposition au cours du 3 ^{eme} trimestre possède les mêmes trefocoe avec une exposition au cours du 3 ^{eme} trimestre possède les mêmes tendances mais reste plus faible et imprécise.
Marqueurs de pollution atmosphérique	PM _{2,5} , HAP, ozone, NO ₂ et SO ₂	NO, NOX, taux de circulation aux abords du lieu de résidence	NO ₂ (PM _{2,5} en covariable)	PM ₁₀	$PM_{2,5}$ et CO (incendies)	Benzène	PM _{3,5} ; aborbance de PM _{3,5} et NO ₂	Proximité trafic routier, carbone suie et PM ₂₅
Nombre participants	1916 couples	100190 naissances	2,5 millions naissances	63818 naissances	6147 naissances	271 femmes enceintes (non fumeuses)	1016 naissances	2128 participants
Période d'étude	1994 - 1999	1997 - 2006	1999 - 2008	2000 - 2006	2004 - 2005	2005 - 2006	1998 - 1999	1999 - 2002
Pays	République tchèque	Suède (Stockholm)	Canada	Brésil (San André aux alentours de Sao Paulo)	Brésil	France (Nancy/Poitiers)	Allemagne (Munich)	Etats-Unis
Cohorte						EDEN	LISA	Viva

Tableau A.9 | Etudes épidémiologiques – Effets sur la croissance fœto-placentaire

Référence	Lakshmanan et al 2015	Ritz et al 2014	Baiz et al 2012	Bertin <i>et al</i> 2015 (a)	Lavigne et al 2016	Rahmalia et al 2012	Bertin et al 2015 (b)	Habermann et Gouveia 2014
Résultats	Association entre l'augmentation de la concentration en PM ₂₅ et une réduction du poids de naissance des garçons des femmes obèses. Les résultats sont identiques pour le carbone suie.	Association mise en évidence entre une augmentation de la concentration en NO, NO ₂ et NOx entre les semaines 29 et 37 de grossesse et une diminution du diamètre bipariétal à la 37 ^{ème} semaine de grossesse	Exposition aux PM ₁₀ et NO ₂ pendant la totalité de la grossesse. Une association a été mise en évidence entre une augmentation de 10µg/m ³ de la concentration en NO ₂ et PM ₁₀ et une réduction de la concentration en vitamine D chez le nouveau-né. Cette association est plus forte en cas d'exposition au 3 ^{eme} trimestre.	Association mise en évidence entre un risque plus élevé de naissances prématurées et la pollution en zone urbaine (concentration en NO $_{2}$ plus élevée).	Association entre l'augmentation de la concentration en NO ₃ , O ₃ et PM _{3,5} et une augmentation du risque de prématurité. Cette association est amplifiée par des pathologies chez la mère comme le diabète, l'asthme et la pré-éclampsie.	A Nancy, il a été mis en évidence une association entre les concentrations en polluants atmosphériques et une diminution du poids placentaire ainsi que du rapport du poids du placenta sur le poids de fœtus. A Poitiers, l'association est opposée entre l'augmentation de la concentration en polluants et une augmentation du poids placentaire.	Association entre une augmentation de la concentration en NO $_{2}$ et une augmentation du poids et de la circonférence de la tête des nouveau-nés garçons.	Association a été mise en évidence entre le dernier quartile de la concentration en PM et une diminution du risque de PPN, la même association a été observée pour la production de particules associée à la distance du lieu de résidence.
Marqueurs de pollution atmosphérique	Carbone suie et PM $_{2,5}$	CO, NO, NO $_{2}$ NOX, O $_{3}$ et PM $_{10}$	PM_{10} et NO_2	NO2	NO ₂ , O ₃ et $PM_{2,5}$	NO2 et PM10	NO ₂	Distance entre le lieu de résidence et les axes à trafic routier dense, la production de particules associée à la distance du lieu de résidence et PM
Nombre participants	670 paires mère/enfant (mère anglaise ou espagnole)	500 femmes enceintes	375 paires mère/enfant	1550 (urbaine) et 959 (rurale) femmes	818400 naissances	271 paires mère/enfant	1550 (urbaine) et 959 (rurale) femmes	11586 naissances (5772 LBW et 5814 contrôles)
Période d'étude	2002 - 2009	1993 - 1996	2003 - 2005	2002 - 2006	2005 - 2012	2005 - 2006	2002 - 2006	2006
Pays	Boston	Californie (Los Angeles)	France (Poitiers/Nancy)	France (Bretagne)	Canada	France	France (Bretagne)	Brésil (Sao Paulo)
Cohorte			EDEN	PELAGIE		EDEN	PELAGIE	

Tableau A.9 | Etudes épidémiologiques – Effets sur la croissance fœto-placentaire

Pays	Période d'étude	Nombre participants	Marqueurs de pollution atmosphérique	Résultats	Référence
Californie (San Joaquin Valley)	19997 - 2006	813 naissances avec problèmes et 828 contrôles	Densité du trafic, CO, PM _{io} et PM _{2,5}	PM. ₁₀ et la densité du trafic pourraient contribuer à l'occurrence de pathologies cardiaques comme la sténose de la valve pulmonaire ou des défauts du septum ventriculaire, les concentrations en PM. ₂₅ et CO étant aussi associées à des pathologies cardiovasculaires	Padula <i>et al</i> 2013
Italie	2001 - 2010	8503 naissances	SO ₂ et PM total	Association mise en évidence entre le 90 ^{ème} percentile de SO ₂ et les pathologies cardiaques congénitales et les défauts du septum ventriculaire	Gianicolo <i>et</i> al 2014

4.1.1. Effets sur la fertilité, la grossesse et la croissance fœtale

Fertilité. A Teplice en république tchèque, la fertilité (capacité à concevoir des enfants) des femmes en âge de procréer pendant le premier mois de rapports sans protection est fonction de l'exposition à la pollution atmosphérique (concentrations atmosphériques en $PM_{2,5}$, HAP, O_3 , NO_2 et SO_2) (**Tableau A.9**). Vingt-cinq pourcents des femmes ont débuté une grossesse au cours du premier mois de rapports sans protection. Chaque augmentation de 10 µg/m³ des concentrations atmosphériques en $PM_{2,5}$ est associée avec une diminution de la fertilité de 22%. Les mêmes tendances sont observées pour le NO_2 . Par contre, aucun effet délétère des autres polluants atmosphériques sur la fertilité n'a été mis en évidence (Slama *et al.* 2013).

Les pathologies non infectieuses les plus fréquentes pendant la grossesse sont le RCIU associé ou non à une pré-éclampsie (syndrome lié à un défaut d'invasion lors de l'implantation)(Tsatsaris *et al.* 2010; Geyl *et al.* 2014). Le RCIU et la pré-éclampsie sont tous deux dus à une hypoperfusion placentaire et affectent plus de 15% des grossesses (10% pour le RCIU et 4 à 7% pour la pré-éclampsie). Enfin, la prématurité affecte plus de 7% des naissances en France et est en constante augmentation (Valery *et al.* 2015).

Grossesse. Une étude épidémiologique suédoise a mis en évidence un lien entre l'augmentation des concentrations atmosphériques en NO_x et l'apparition de troubles maternels hypertensifs de la grossesse (Olsson *et al.* 2015). Dans une étude épidémiologique française, la comparaison de zones rurales et urbaines en Bretagne a montré que le risque de naissances prématurées est plus fort en zone urbaine où la concentration en NO₂ est plus élevée (Bertin *et al.* 2015b). Cette corrélation est amplifiée par des pathologies maternelles telles que le diabète, l'asthme ou la pré-éclampsie (Lavigne *et al.* 2016).

Croissance fœtale. Les résultats des études épidémiologiques sont variables et parfois contradictoires. Les effets de l'exposition maternelle à la pollution atmosphérique dépendent en effet de la nature des polluants et de la catégorie socio-économique des sujets. Dans de nombreuses études, une augmentation de la concentration atmosphérique en polluants est associée à une augmentation du risque de petit poids

pour l'âge gestationnel (PAG) (odds ratio* (OR) de 1,04) (Stieb *et al.* 2016), du risque de petit poids de naissance* (PPN) (OR de 1,01 à 1,50, généralement calculés pour les concentrations les plus élevées) (Slama *et al.* 2009; Romao *et al.* 2013; da Silva *et al.* 2014) et de la prévalence de poids de naissance inférieur à 3kg (OR de 1,08 à 1,73, en fonction des concentrations en $PM_{2,5}$) (Slama *et al.* 2007). De plus, une corrélation entre la distance du lieu de résidence et un trafic routier dense avec l'augmentation du risque de PPN est démontrée (Fleisch *et al.* 2015). Dans une étude américaine, une diminution du poids de naissance en rapport avec l'augmentation de la concentration en PM2,5 est observée chez les garçons dont les mères sont obèses (34,5% de la cohorte étudiée) (Lakshmanan *et al.* 2015).

L'augmentation de la concentration atmosphérique en NO_x est associée à une diminution du diamètre bipariétal à la 37^{ème} semaine de grossesse (Ritz *et al.* 2014). Une augmentation de la concentration en NO_x dans l'air environnant la femme enceinte est associée chez le nouveau-né à une réduction de la concentration plasmatique en vitamine D, impliquée dans de nombreux processus cellulaires et métaboliques dont le métabolisme des os et du calcium (Baiz *et al.* 2012).

Une étude française a comparé les concentrations atmosphériques en polluants, notamment en NO₂, dans les villes de Nancy et de Poitiers. Les concentrations atmosphériques en polluants sont plus élevées à Nancy qu'à Poitiers. A Nancy, une augmentation des concentrations atmosphériques en polluants est associée à une diminution du poids placentaire ainsi que du rapport du poids du placenta sur le poids de fœtus, alors qu'à Poitiers, l'augmentation de la concentration en polluants est associée à une augmentation du poids placentaire (Rahmalia *et al.* 2012).

Plusieurs études ont obtenu des résultats contradictoires avec ceux présentés précédemment. En France, en Bretagne, une corrélation positive entre la concentration en NO₂ et le poids et la circonférence de la tête des nouveau-nés garçons a été mise en évidence (Bertin *et al.* 2015a). *A contrario*, dans la ville de Sao Paulo au Brésil, une corrélation négative entre la concentration en PM10 et le risque de PPN a été observée. Les auteurs expliquent ce résultat par le fait que l'augmentation de l'exposition à la

^{*}Odds ratio : Il est défini comme un « rapport des cotes » où la probabilité d'un évènement dans un groupe d'étude est rapportée à la probabilité de ce même événement dans le groupe témoin. L'OR se rapproche du risque relatif. Un OR est toujours supérieur ou égal à 0. Lorsqu'il est égal à 1 cela correspond à l'absence d'effet, lorsqu'il est inférieur à 1 c'est un effet bénéfique et lorsqu'il est supérieur à 1 il s'agit d'effet délétère. Plus il est éloigné de 1 et plus l'effet est important.

^{*}Petit poids de naissance (LBW : « Low Birth Weight ») : ce sont des enfants avec un poids de naissance inférieur à 2500 g quelque soit l'âge gestationnel.

Tableau A.10 | Etudes épidémiologiques – Effets sur la descendance

Référence	Fleisch <i>et al</i> 2015	Ghosh <i>et al</i> 2013	Von Ehrenstein et al 2014
Résultats	Association mise en évidence entre la proximité d'un trafic routier dense et un plus petit poids de naissance, une croissance post-natale accélérée et possèdent un poids-pour-longueur plus élevé à 6 mois. Les auteurs ont mis en évidence les mêmes associations pour cette proximité du trafic routier et pour une exposition au carbone suie au 3 ^{eme} trimestre, l'association entre la croissance fœtale et post-natale précoce avec une exposition au cours du 3 ^{eme} trimestre possède les mêmes trefocoe avec une exposition au cours du 3 ^{eme} trimestre possède les mêmes tendances mais reste plus faible et imprécise.	Au cours de la grossesse, une augmentation des concentrations en NO et NO ² est associée à une augmentation du risque pour l'enfant de développer une leucémie lymphoblastique aigüe et l'exposition maternelle aux $2^{\rm eme}$ et $3^{\rm eme}$ trimestre est associée à une augmentation du risque d'occurrence d'un rétinoblastome bilatéral	Le risque de développer un autisme pendant l'enfance est accentué avec une augmentation de la concentration de plusieurs polluants (1,3-butadiène, méta/para- xylène, d'autres solvants aromatiques, plomb, perchloroéthylène et formaldéhyde)
Marqueurs de pollution atmosphérique	Proximité trafic routier, carbone suie et PM. ₃₅	NO, NO₂ et NOỵ	24 polluants atmsophériques suspectés ou connus pour être neurotoxique ou posséder une toxicité neurodéveloppementale
Nombre participants	2128 participants	4015 naissances (enfants suivis jusqu'à 5 ans)	148722 naissances dont 768 enfants ayant déclarés un autisme
Période d'étude	1999 - 2002	1988 - 2008	1995 - 2006 (données autisme entre 1998 - 2009)
Pays	Etats-Unis	Californie	Californie (Los Angeles)
Cohorte	Viva	Air Pollution and Childhood Cancer	

pollution est contrebalancée par le profil socio-économique élevé des familles étudiées (Habermann & Gouveia 2014).

Malformations fœtales. Une augmentation du risque d'apparition de pathologies et d'anomalies cardiaques à la naissance est associée à une augmentation de la concentration atmosphérique de certains polluants et de la densité du trafic routier (Gianicolo *et al.* 2014; Padula *et al.* 2014).

4.1.2. Conséquences post-natales d'une exposition in utero chez l'Homme

Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre une exposition in utero et le développement de pathologies au cours de l'enfance (Tableau A.10). Les femmes enceintes vivant proches de grands axes routiers ont plus de risque de donner naissance à des enfants avec un petit poids de naissance (Fleisch et al. 2015) (voir A§4.1.1). Dans cette même étude, non seulement les enfants exposés in utero à la pollution ont un poids de naissance plus faible, mais ils ont aussi une croissance plus rapide du rapport poids/taille dans les 6 premiers mois après la naissance. De plus, ce ratio est plus élevé à l'âge de 6 mois indiquant une croissance de rattrapage chez ces nourrissons (Fleisch et al. 2015). Au cours de la grossesse, une augmentation des concentrations atmosphériques en NO_x est associée à une augmentation du risque infantile de développement d'une leucémie lymphoblastique aiguë de 9%, 23% et 8%, respectivement. De plus, l'exposition maternelle aux 2^{ème} et 3^{ème} trimestres est associée à une augmentation de 13 à 15% du risque d'occurrence d'un rétinoblastome bilatéral chez l'enfant (Ghosh et al. 2013). Enfin, une étude épidémiologique à grande échelle, incluant plus de 148 000 naissances et l'analyse de 24 polluants atmosphériques suspectés ou connus pour leur neurotoxicité, a démontré que l'augmentation du risque de développer un autisme pendant l'enfance est associée à une augmentation de la concentration atmosphérique de plusieurs polluants pendant la grossesse (1,3-butadiène, méta/paraxylène, solvants aromatiques, plomb, perchloroéthylène et formaldéhyde) (von Ehrenstein et al. 2014).

In vitro : Les cellules BeWo, lignée cellulaire dérivée d'un choriocarcinome, sont utilisées dans des modèles d'insert Transwell® . Ces modèles *in vitro* comprennent une membrane poreuse recouverte d'une monocouche de cellules séparant deux compartiments liquides, mimant le compartiment maternel et le compartiment fœtal. Le transfert transplacentaire est mesuré par différence entre la dose insérée dans le compartiment apical (maternel) et le compartiment basal (fœtal).

Ex vivo – placenta perfusé : Dans ce modèle, un cotylédon isolé d'un placenta humain à terme est perfusé afin de mimer les circulations maternelle et fœtale. Des particules en suspension peuvent être injectées dans la « circulation maternelle » et leur concentration peut être mesurée dans la « circulation fœtale ».

In vivo – Inhalation/Injection/Instillation :

Inhalation : Les animaux évoluent dans des chambres d'inhalation où ils sont exposés soit à de l'air extérieur pollué non filtré, soit à des gaz d'échappement dont la concentration est mesurée. Les animaux, essentiellement des rongeurs, inhalent les gaz et les particules, mais ils peuvent aussi les ingérer en se léchant le pelage. Une seconde technique d'inhalation est la technique « nose-only », comme utilisée dans ces travaux. Pour cela, les animaux sont placés dans des dispositifs (tubes) au cours de l'exposition, permettant une exposition au niveau des voies respiratoires uniquement.

Injection : Différentes voies d'injections sont utilisées. Il peut s'agir d'injections intrapéritonéales, intraveineuses (généralement dans la queue des rongeurs) ou sous-cutanées.

Instillation : Cette technique nécessite une anesthésie très légère des animaux. La contention des animaux permet le dépôt de la quantité souhaitée de particules en suspension dans la trachée, à l'aide d'une pipette.

Encart A.3 | Modèles d'évaluation du transfert fœto-placentaire de polluants atmosphériques et techniques d'exposition utilisées dans les modèles animaux

4.2. Modèles animaux

Afin de vérifier les résultats obtenus dans les études épidémiologiques et d'analyser les mécanismes sous-jacents aux effets observés, des modèles animaux ont été mis en place. Il s'agit essentiellement de modèles rongeurs. La complexité de l'interprétation de ces études vient de la grande diversité dans les modèles utilisés (Encart A.3), les polluants étudiés, leur dosage et les stades de gestation explorés.

Dans cette partie, j'ai choisi de présenter les études concernant une exposition *in utero* par inhalation à des gaz d'échappement de moteur diesel, nous paraissant la plus proche de l'Homme et de nos travaux. Cependant, j'ai complété cette partie avec des études sur les effets d'une exposition *in utero* à des nanoparticules manufacturées sur la descendance.

Les études présentées utilisent différentes techniques et concentrations d'exposition, rendant difficile leur comparaison. Pour plus de précision, les détails des expositions sont présentés dans le **Tableau A.11**, **A.12**, **A.13** et **A.14** pour la croissance fœtoplacentaire, les effets sur les descendants de la naissance à la puberté, sur les descendants adultes et les effets d'une exposition continue sur plusieurs générations.

Pour des raisons de clarté, j'ai fait le choix de classer les études selon les périodes d'analyse des effets comme décrit ci-dessus, au sein de ces paragraphes les études sont organisées selon la technique d'exposition. Pour les modèles d'inhalation de gaz d'échappement de moteur diesel (DE), lorsque je parle de concentrations « faibles », « moyennes » ou « fortes », je me suis appuyée sur les recommandations de l'OMS.

4.2.1. Effets sur la femelle gravide et la croissance fœto-placentaire

4.2.1.1. Exposition par inhalation

L'exposition de rates gravides à des concentrations faibles DE pendant la première moitié de la gestation perturbe la régulation endocrine de la gestation. Chez la rate, la stéroïdogenèse lutéale est réduite avec une diminution de l'expression d'enzymes clés impliquées dans les voies de synthèse des stéroïdes, induisant une réduction des concentrations plasmatiques en P4 et E2 et une augmentation des concentrations en LH (*Luteinizing Hormone*). De façon étonnante, les fœtus exposés *in utero* sont plus lourds et leur taille est réduite (Li *et al.* 2013). Chez la souris, une exposition à des concentrations faibles au DE pendant la quasi-totalité de la gestation induit une augmentation du nombre Tableau A.11 | Modèles animaux – Effets sur la croissance fœto-placentaire

Référence	Li et al 2013	Weldy <i>et al</i> 2014	Fujimoto <i>et al</i> 2005	Bolton et al 2012	Hougaard et <i>al</i> 2013
Résultats	 > ratio du poids du foie et du poids de la rate rapporté poids maternel. > concentration plasmatique en P4 > concentrations plasmatiques en LH et corticostérone > concentration plasmatique en oestradiol-17β dans groupe F-DE. > expressions géniques de l'enzyme P450, la 3β-HSD et le récepteur à LH dans le corps lutéal. Fœtus sont plus lourds et plus courts dans les 2 groupes pollués 	A nombre de résorptions embryonnaires et fœtales Placenta : Hémorragies et congestions, nécrose, compaction des espaces vasculaires labyrinthiques, infiltration de cellules immunitaires et stress oxydatif	 λ nombre de résorptions fœtales et congestion placentaire. λ expressions géniques des IL2, IL5, IL12α et IL12β, IL6 et GM-CSF (fonction immune du placenta) jusqu'à 10 fois pour certaines dans les placentas pollués 	A 18jpc (cerveau fœtaux): 7 réponse des cytokines proinflammatoires et chémokines (IL1béta, IL6, CCL2/MCP-1 et CX3CL1/Fractalkine) et inhibiteur de la synthèse de cytokines (IL10) dans le groupe pollué.	Inflammation pulmonaire ∿ taux de naissance (implantation précoce)
Fonction étudiée	Endocrinologie Croissance fœtale	Croissance fœto- placentaire	Croissance fœto- placentaire	Inflammation (cerveau)	Inflammation (poumons) et croissance fœtale
Age aux observations (Sexe)	Mères gestantes et fœtus à 20 jpc	12 semaines post-natales (mâles)	Placentas à 14 jpc	18 jpc et 60 jpn (mâles et femelles)	Mères exposées
Polluant (Concentration)	NR-DE (148,86µg/m ³ , 1.83×10 ⁶ NPs/cm ³) F-DE (3.10 µg/m ³ , 2.66 NPs/cm ³)	DE (300µg/m ³)	DE (0,3/1/3mg/m ³)	DE (2 mg/m ³)	Nanotubes de carbone (67µg, dose totale de 268µg sur la gestation)
Technique (Effectifs, période et temps d'exposition)	Chambre d' inhalation (6 femelles gestantes par groupe, 1 à 9 jpc, 5h/jour)	Chambre d' inhalation (3C vs 4E, 0,5 à 17,5 jpc, 6h/jour, 5jours/semaine)	Chambre d' inhalation (32C vs 26E, 26P et 31P, 2 à 13 jpc, 12h/jour et 7jours/7)	Chambre d' inhalation (6C vs 6E, 9 à 17 jpc, 4h/jour)	Instillation intratrachéale (22 femelles gestantes par groupe, 8 à 18 jpc, à 8, 11, 15 et 18 jpc)
Espèce, lignée	Rats F344	Souris C57BL/6	Souris ICR	Souris C57BL/6	Souris C57BL/6

C: Contrôles; DE: Diesel Exhaust; E: Exposé; F-DE: Filtered Diesel Exhaust; jpc: jours post-conception; jpn: jours post-nataux; NR-DE: Nanoparticles-Rich Diesel Le temps de gestation chez la souris est de 19-21 jours et chez le rat il est d'environ 22 jours. Exhaust.

Tableau A.11 | Modèles animaux – Effets sur la croissance fœto-placentaire

Référence	Hong et al 2014	Hong et al 2014	Yu et al 2014	Zhang et al 2015	Di Bona et al 2014
Résultats	Effets toxiques chez la mère:	<pre>Effets toxiques chez la mère:</pre>	√ activité de la catalase et de la glutathion réductase (≥100mg) √ concentration en glutathion (forte) Pas d'effets toxiques sur la gestation ou l'unité fœto-placentaire.	7 progression des cellules de la lignée germinale femelle chez les fœtus. Perturbation de l'expression de plusieurs gènes soumis à empreinte à G15,5 Perturbation de la méthylation de l'ADN dans certaines région du gène Zacı.	A mort fœtale Accumulation de particules de fer dans le placenta et dans le foie fœtal Deux types de particules (dépendants de leur charge) sont capable de traverser le placenta et atteindre le fœtus, mais particules chargées positivement ont des effets toxiques plus délétères.
Fonction étudiée	Comportement et biométrie maternels et croissance fœtale	Comportement et biométrie maternels et croissance fœtale	Foie maternel et croissance fœto- placentaire	Croissance fœto- placentaire et méthylation	Croissance fœto- placentaire
Age aux observations (Sexe)	Fætus 20 jpc	Fætus 20 jpc	Mères gestantes et fœtus à 20 jpc	Unités foeto- placentaires à 13,5; 15,5 et 17,5 jpc	Mères gestantes et unités foeto- placentaires à 17 jpc
Polluant (Concentration)	Nanoparticules d'oxyde de zinc avec coating L-Sérine (100/200/400mg/kg/jour)	Nanoparticules d'oxyde de zinc avec coating molécules de citrate (100/200/400mg/kg/jour)	Nanoparticules d'argent (100/300/1000mg/kg/jour)	Nanoparticules d'argent (8 nm de diamètre)(1mg NPs/kg)	Nanoparticules de fer avec différentes charges de surface (10mg NPs/kg =2,5 mg Fe/kg)
Technique (Effectifs, période et temps d'exposition)	Gavage oral (23C vs 24E, 21E et 23E, 5 à 19 jpc, 1 gavage par jour)	Gavage oral (23C vs 24E, 21E et 23E, 5 à 19 jpc, 1 gavage par jour)	Gavage oral (11 femelles inséminées par groupe, 6 à 19 jpc, 1 fois par jour)	Injection intraveineuse (20 femelles gestantes par groupe, 6,5 jpc, 1 injection)	Injection intrapéritonéale (Entre 14 et 18 femelles gestantes par lot, 9 jpc ou de 9 à 18 jpc à 1 injection par jour)
Espèce, lignée	Rats Sprague- Dawley	Rats Sprague- Dawley	Rats Sprague- Dawley	Souris ICR	Souris CD-1

C: Contrôles; DE: Diesel Exhaust; E: Exposé; F-DE: Filtered Diesel Exhaust; jpc: jours post-conception; jpn: jours post-nataux; NR-DE: Nanoparticles-Rich Diesel Le temps de gestation chez la souris est de 19-21 jours et chez le rat il est d'environ 22 jours. Exhaust.

de résorptions embryonnaires et fœtales accompagnées de lésions placentaires importantes (hémorragies, congestions, nécrose, compaction des espaces vasculaires de la zone labyrinthique, infiltration de cellules immunitaires et stress oxydatif vasculaire) et de l'inflammation avec l'augmentation des expressions géniques des cytokines proinflammatoires IL2, IL5, IL12 α et IL12 β , IL6 (Interleukines 2, 5,12 α , 12 β et 6) et GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Fujimoto *et al.* 2005; Weldy *et al.* 2014).

Lors de l'exposition de souris à des concentrations élevées en DE pendant la première moitié ou la quasi-totalité de la gestation, l'inflammation est amplifiée à 14 jpc, notamment avec l'expression des gènes impliqués dans la fonction immunitaire placentaire comme l'IL-6 (augmentation d'un facteur 10 de cette cytokine proinflammatoire) (Fujimoto *et al.* 2005). De plus, ce type d'exposition entraine une augmentation de la concentration tissulaire de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL1 β et IL6), chémokines (CCL2/MCP-1 et CX3CL1/Fractalkine) et d'un inhibiteur de la synthèse de cytokines (IL10) dans le cerveau des fœtus de souris à 18 jpc, suggérant des effets délétères importants chez les fœtus (Bolton *et al.* 2012).

4.2.1.2. Autres techniques d'exposition

4.2.1.2.1. Instillation

Une exposition maternelle à des nanotubes de carbone par instillation intratrachéale chez la souris induit une inflammation pulmonaire maternelle ainsi qu'une diminution de la prolificité, sans différence du nombre de sites d'implantation suggèrant un problème de fertilité ou une mortalité embryonnaire précoce (Hougaard *et al.* 2013).

4.2.1.2.2. Gavage oral

Des rates gravides ont été exposées par gavage oral à des concentrations faibles, moyennes ou fortes de nanoparticules d'oxyde de zinc chargées positivement ou négativement (20 nm de diamètre). L'exposition aux fortes doses entraine des effets toxiques chez la mère, avec une réduction de la consommation alimentaire et des poids corporel et hépatique, ainsi qu'avec une augmentation du poids des glandes surrénales, signalant une réponse au stress. Seule l'exposition à une dose forte des nanoparticules chargées positivement entraine une réduction du poids des fœtus ainsi qu'une

augmentation de l'incidence de malformations (Hong *et al.* 2014a; Hong *et al.* 2014b). Dans la même espèce, le gavage oral avec des nanoparticules d'argent en concentrations faible, moyenne ou forte induit des signes de stress oxydatif au niveau hépatique chez la mère, avec une réduction de l'activité de la catalase et de la glutathion réductase. Aucun effet toxique n'est observé sur les paramètres de gestation ou l'unité fœto-placentaire (Yu *et al.* 2014).

4.2.1.2.3. Injections

Chez la souris gravide, l'injection de nanoparticules d'argent affecte le développement des gonades fœtales avec une accélération de la méiose des cellules de la lignée germinale chez les fœtus femelles. De plus, cette exposition maternelle perturbe l'expression placentaire de plusieurs gènes soumis à empreinte à 15,5 jpc et la méthylation de l'ADN dans certaines régions du gène placentaire *Zac1*, régulant un réseau de gènes soumis à l'empreinte qui contrôle la croissance embryonnaire (Zhang *et al.* 2015). Des souris gravides ont été exposées à des nanoparticules de fer chargées positivement ou négativement à une concentration équivalente à celles reçues lors d'une IRM. L'exposition aux nanoparticules de fer chargées positivement pendant plusieurs jours entraine une augmentation de la létalité fœtale, ainsi que l'accumulation de particules de fer dans le placenta et d'atteindre le fœtus, mais les particules de fer chargées négativement (Di Bona *et al.* 2014).

4.2.2. Effets chez les descendants de la naissance à la puberté

Des effets délétères d'une exposition *in utero* sont observés sur les descendants de la naissance à la puberté. Les effets observés touchent surtout l'inflammation, la réponse immunitaire et la fonction neurologique, effets associés au stress oxydatif. Ces effets sont parfois différents selon le sexe des individus.

4.2.2.1. Exposition par inhalation

Chez la souris gravide, l'inhalation d'une concentration faible de DE réduit l'activité locomotrice spontanée des descendants à 28-35 jpn (jours post-nataux, 4-5 semaines).

Tableau A.12 | Modèles animaux – Effets sur la descendance de la naissance à la puberté

Référence	Blum et al 2015	Suzuki et al 2010	Hougaard et al 2008	El-Sayed <i>et</i> al 2015	Shimizu et al 2014	Mohammad ipour <i>et al</i> 2014
Résultats	Problèmes rénaux (/² concentration et expression Kim-1) chez la mère exposée et chez les descendants	\checkmark activité locomotrice spontanée des descendants \nearrow concentration en dopamine et noradrénaline dans le cortex préfrontal	> légère du poids des individus peu après la naissance, diminution qui devient plus importante au cours de la lactation, au sevrage le groupe pollué est plus léger que le groupe témoin	7 nombre de thymocytes totaux Dans la rate: 7 nombre de lymphocytes et des lymphocytes immature CD4 ^T CD8 ^T CD8 ^T	↘ nombre de cellules T juste après la naissance mais ce phénotype disparait à 14 jpn.	√ prolifération cellulaire dans l'hippocampe des descendants à 1 jpn.
Fonction étudiée	Fonction rénale	Fonction neurologique et comportement	Poids (naissance au sevrage)	Fonction immune	Fonction immune	Fonction neurologique et comportement
Age aux observations (Sexe)	Mères gestantes et descendants à 7 et 14 jpn	4-5 semaines post-natales (mâles)	2 (juste après la naissance), 9 (lactation), 22 (sevrage) et 23- 24 jpn	5 jpn (mâles)	1,3,5 et 14 jpn	1 et 60 jpn (mâles)
Polluant (concentration)	Nanoparticules d'oxyde de cadmium (230µg/m³)	DE (171 µg/m³)	DEP (19mg/m³)	Carbone suie (95µg/mL avec instillation de 1mL/kg)	Carbone suie (95µg/kg/fois)	Nanoparticules de dioxyde de titane (100mg/kg)
Technique (Effectifs, période et temps d'exposition)	Inhalation nose-only (Entre 4 et 8 femelles gestantes par lots traités, De 4,5 jpc à 9,5 jpc ou 13,5 jpc ou 16,5 jpc, 2.5h/jour, 7jours/7)	Chambre d 'inhalation (14C vs 12E, 2 à 16 jpc, 8h/jour, 5 j/semaine)	Chambre d 'inhalation (20C vs 20E, 9 à 19 jpc, 1h/jour)	Instillation intranasale (8C vs 11E, 9 jpc et 15 jpc, 1 instillation par jour)	Instillation intranasale (28C vs 26E, 5 jpc et 9 jpc, 1 instillation à chaque fois, 2 instillations en gestation précoce)	Gavage oral (6C vs 6E, 2 à 21 jpc, 1 gavage par jour)
Espèce	Souris CD-1	Souris ICR	Souris C57BL/6	Souris ICR	Souris ICR	Rats wistar

C: Contrôles; DE: Diesel Exhaust; DEP: Diesel Exhaust Particles; E: Exposés; F-DE: Filtered Diesel Exhaust; jpc: jours post-conception; jpn: jours post-nataux. Le temps de gestation chez la souris est de 19-21 jours et chez le rat il est d'environ 22 jours. Tableau A.12 | Modèles animaux – Effets sur la descendance de la naissance à la puberté

Référence	Manners et al 2014	Cui et al 2014	Wu et <i>al</i> 2015
Résultats	Développement d'asthme dépendant des cellules NK A transcription de gènes régulateurs du stress oxydatif	Dérégulation du statut oxydatif Effets oxydatifs délétères sur les acides nucléiques et les lipides	 Concentration en Ag dans l'hippocampe (NPs sans coating) Atteinte de la structure de l'hippocampe (NPs sans coating) expressions géniques et protéiques de GAP-43 (tous les groupes, < NPs sans coating)
Fonction étudiée	Asthme et stress oxydatif	Stress oxydatif (cerveaux descendants)	Fonction neurologique
Age aux observations (Sexe)	observations (Sexe) 27 jpn		35 jpn (mâles)
Polluant (concentration)	Polluant (concentration) DEP en suspension (5оµg de DEP dans 5оµL de PBS)		Nanoparticules d'argent (sans coating, avec PVP- coating)(20mg/mL
Technique (Effectifs, période et temps d'exposition)	Injection intranasale (9C vs 15E, 3 à 18 jpc, 1 injection sous anesthésie tous les 3 jours (1 injection divisée en 2 injections de 25µL espacée de 15 minutes 1/narine))	Injection sous-cutanée (8C vs 8E, 6 à 18 jpc, 1 fois tous les 3 jours	Injection intrapéritonéale (6 groupes de 6 femelles gestantes, 10 à 18 jpc, 1 fois tous les 2 jours)
Espèce	Souris C57BL/6	Rats Sprague- Dawley	Rats Sprague- Dawley

C: Contrôles; DE: Diesel Exhaust; DEP: Diesel Exhaust Particles; E: Exposés; F-DE: Filtered Diesel Exhaust; jpc: jours post-conception; jpn: jours post-nataux. Le temps de gestation chez la souris est de 19-21 jours et chez le rat il est d'environ 22 jours.

Cette baisse d'activité pourrait être en partie expliquée par l'augmentation de la concentration en dopamine et noradrénaline dans le cortex préfrontal (Suzuki *et al.* 2010). Grâce à une technique d'inhalation « nose-only », technique équivalente à celle utilisée dans cette thèse, des souris gravides ont été exposées à de faibles concentrations de nanoparticules d'oxyde de cadmium. L'exposition gestationnelle aux oxydes de cadmium entraine des problèmes rénaux chez la mère et chez les descendants à 7 et 14 jpn (jour post-natal), liée une augmentation de la concentration et de l'expression du marqueur Kim-1 (*Hepatitis A virus cellular receptor 1*) (Blum *et al.* 2015). Une exposition de la souris gravide à de fortes concentrations de DE entraine une légère diminution (-5,7%) du poids des descendants peu après la naissance, devenant plus marquée au cours de la lactation. Au sevrage, les individus exposés *in utero* ont un poids plus faible que ceux du groupe témoin. L'exposition *in utero* n'a que peu d'effets sur la fonction cognitive des femelles (Hougaard *et al.* 2008).

4.2.2.2. Autres techniques d'exposition

4.2.2.2.1. Instillation

L'exposition *in utero* de souris gravides à des nanoparticules de carbone suie perturbe le système immunitaire avec une diminution du nombre de lymphocytes T juste après la naissance, mais ce phénotype disparait à 14 jpn. Cette exposition supprime ainsi partiellement le développement du système immunitaire des nouveau-nés (Shimizu *et al.* 2014). Dans les mêmes conditions expérimentales, l'exposition aux nanoparticules de carbone suie entraine une augmentation des thymocytes totaux. L'exposition entraine une augmentation du nombre de lymphocytes, notamment lymphocytes immatures (CD4⁻ CD8⁻) dans la rate des mâles à 5 jpn. Cette perturbation du nombre de lymphocytes pourrait entrainer des réactions allergiques et immunitaires chez les descendants mâles à l'âge adulte (El-Sayed *et al.* 2015).

4.2.2.2.2. Gavage oral

Chez la rate gravide, le gavage oral avec une faible concentration en nanoparticules de dioxyde de titane perturbe la neurogenèse avec une diminution de la prolifération cellulaire dans l'hippocampe des descendants à 1 jpn, pouvant entrainer des effets sur la mémoire et le comportement à l'âge adulte (Mohammadipour *et al.* 2014).

4.2.2.2.3. Injection

Chez la souris gravide, une injection intranasale de particules de diesel favorise le développement d'asthme (dépendant des cellules Natural Killer) chez les descendants à 27 jpn, associé à une augmentation de la transcription de gènes régulateurs du stress oxydatif dans le foie et les poumons (Manners et al. 2014). Des rates gravides ont été exposées à des nanoparticules de dioxyde de titane, entrainant une dérégulation du statut oxydatif de la descendance, avec notamment des effets oxydatifs délétères sur les acides nucléiques et les lipides du tissu cérébral des nouveau-nés à 2 jpn (Cui et al. 2014). Chez la rate gravide, l'injection de nanoparticules d'argent recouvertes ou non de polyvinylpyrrolidine (PVP), induit, dans le cas des particules sans PVP, une augmentation de la concentration en argent et une modification de la structure de l'hippocampe des descendants mâles à 35 jpn. Les expressions génique et protéique de GAP-43 (Growth Associated Protein-43, phosphoprotéine spécifique au neurone impliquée dans le développement initial et le remodelage des connections neuronales) sont diminuées dans tous les groupes exposés aux particules, et de façon plus importante dans le cas des particules sans PVP. Ces altérations se traduisent par une dérégulation de la cognition spatiale des descendants mâles, explicable par la diminution de l'expression de GAP-43. Le coating PVP semble réduire la toxicité des particules liée au relargage des ions argent (Wu et al. 2015).

4.2.3. Effets chez les descendants adultes

L'exposition *in utero* à des gaz d'échappement de moteur diesel ou des nanoparticules manufacturées a des conséquences sur les descendants jusqu'à l'âge adulte. Elle programme le développement de pathologies respiratoires, cardiovasculaires, métaboliques et neurologiques et affecte les organes de la reproduction.

4.2.3.1. Exposition par inhalation

L'exposition de rates gravides à de faibles concentrations en DE entraine une diminution de la production journalière de sperme liée à un effondrement de la stéroïdogenèse testiculaire et à une réduction du poids de la vésicule séminale et de la prostate des descendants mâles à 28 jpn (Li *et al.* 2009). L'exposition de souris gravides à de faibles concentrations en DE programme une susceptibilité accrue des descendants Tableau A.13 | Modèles animaux – Effets sur la descendance à l'âge adulte

Référence	Li et al 2009	Weldy et al 2014	Ogliari et al 2013	Ono et al 2008	Sharkhuu <i>et</i> al 2010
Résultats	 > poids de la vésicule séminale et de la prostate > concentration en testostérone, progestérone, corticostérone et FSH dans le sérum > concentration en StAR et 17béta-HSD dans le testicule > concentration en StAR et nybéta-HSD dans le sérum > transcription du récepteur à la FSH (NR-DE) 	 ⁷ poids corporel des descendants à l'âge adulte. [↓] pression artérielle sans changement de la fonction cardiaque [↓] pression artérielle sans changement de la fonction cardiaque [↑] susceptibilité à avoir des arrêts cardiaques en cas de surcharge de [↑] susceptibilité à avoir des arrêts cardiaques en cas de surcharge de 	 > proportion de follicules primordiaux (<i>in utero</i>, post-natale et 2 périodes) > proportion de follicules primaires (<i>in utero</i>). Pas de différence pour la morphologie utérine. 	 > production quotidienne de sperme Présence de cellules géantes multinucléées et vacuolisation partielle dans les tubes séminifères. > concentration en testostérone dans le sérum (5 semaines) > expression du récepteur à la LH (5 et 12 semaines) > expression de la 17αhydroxylase/C17-20-lyase et de la 17β-HSD (12 semaines) 	Altération des indices d'inflammation au niveau des poumons (≠ entre les deux sexes) Pas d'effet sur une réponse immunitaire spécifique ou sur une inflammation allergique pulmonaire sévère.
Fonction étudiée	Fonction de reproduction mâle	Fonction cardiaque	Fonction de reproduction femelle	Fonction de reproduction mâle	Inflammation et fonction immune
Age aux observations (Sexe)	28 jpn (mâles)	12 semaines post- natales (måles)	60 jpn (femelles)	5 et 12 semaines post-natales (mâles)	6 semaines post- natales (mâles et femelles)
Polluant (concentration)	NR-DE (148,86µg/m ³ , 1.83х10 ⁶ NPS/cm ³) F-DE (3.10 µg/m ³ , 2.66 NPS/cm ³)	DE (3ооµg/m³)	DE (600µg/m³)	DE (1mg/m³)	DE (o/o.8/3.1mg/m ³)
Technique (Effectifs, période et temps d'exposition)	Chambre d' inhalation (5 femelles gestantes par groupes, 1 à 19 jpc, 5h <i>l</i> jour)	Chambre d' inhalation (3C vs 4E, 0,5 à 17,5 jpc, 6h/jour, 5jours/semaine)	Chambre d' inhalation (5 paires mâle/femelle par groupe, Exposition gestationnelle et postnatale croisée, 1h/jour)	Chambre d' inhalation (14C vs 14E, 2 à 16 jpc, 12h/jour)	Chambre d' inhalation (20 femelles gestantes par groupe, 9 à 18 jpc, 4h/jour)
Espèce, lignée	Rats F344	Souris C57BL/6	Souris Swiss	Souris ICR	Souris BALB/c

C: Contrôles; DE: Diesel Exhaust; DEP: Diesel Exhaust Particles; E: Exposé; F-DE: Filtered Diesel Exhaust; jpc: jours post-conception; jpn: jours post-nataux; NR-DE: Nanoparticles-Rich Diesel Exhaust. Le temps de gestation chez la souris est de 19-21 jours et chez le rat il est d'environ 22 jours.

Tableau A.13 | Modèles animaux – Effets sur la descendance à l'âge adulte

Référence	Yokota et al 2009	Yokota et al 2013	Bolton <i>et al</i> 2012	Hemmingsen et al 2009	Hougaard et al 2008
Résultats	√ locomotion √ turnover de la dopamine dans le striatum et le noyau accumbens	Altération de la coordination motrice et le comportement impulsif > turnover de la noradrénaline dans le cervelet ? même turnover dans l'hypothalamus Modification des concentrations en dopamine et sérotonine dans plusieurs zones du cerveau	 Challenge alimentaire (LFD : 20% protéines, 70% carbohydrate et 10% lipides vs HFD : 20% protéines, 35% carbohydrate et 45% lipides) Avant régime: Avant régime: Avant régime: Poids et \u03c4 activité des måles pollués Pas d'effet chez les femelles. Après régime obésogène: prise de poids de 340% chez femelles pollués Même courbe de prise de poids chez les måles pollués obèses: Insulinémie en comparaison avec måles témoins obèses (tous les måles obèses sont moins actifs et plus anxieux, pas de différence chez les femelles). / activation microgliale chez måles et femelles obèses dans plusieurs régions du cerveau. 		Peu d'effets sur la fonction cognitive des femelles et sur les biomarqueurs de cette exposition ou sur leur génotoxicité
Fonction étudiée	Fonction neurologique et comportement	Fonction neurologique et comportement	Croissance et obésité	Fonction de reproduction mâle	Fonction cognitive (femelles)
Age aux observations (Sexe)	35 jpn (måles)	3, 5 et 6 semaines post- natales	18 jpc et 60 jpn (måles et femelles)	170 jpn (mâles)	2 (juste après la naissance), 9 (lactation), 22 (sevrage) et 23- 24 jpn
Polluant (concentration)	DE (1mg/m ³)	DE (1mg/m ³)	DE (2 mg/m³)	DE (20 mg/m ³)	DEP (19mg/m ³)
Technique (Effectifs, période et temps d'exposition)	Chambre d' inhalation (27 descendants måles dans chaque lot, 2 à 17 jpc, 8h/jour, 5jours/semaine)	Chambre d' inhalation (15C vs 15E, 2 à 17 jpc, 8h/jour, 5jours/semaine)	Chambre d 'inhalation (6C vs 6E, 9 à 17 jpc, 4h/jour)	Chambre d' inhalation (20C vs 20E, 7 à 19 jpc, 1h/jour)	Chambre d' inhalation (20C vs 20E, 9 à 19 jpc, 1h <i>l</i> jour)
Espèce, lignée	Souris ICR	Souris ICR	Souris C57BL/6	Souris C57BL/6	Souris C57BL/6

C: Contrôles; DE: Diesel Exhaust; DEP: Diesel Exhaust Particles; E: Exposé; F-DE: Filtered Diesel Exhaust; jpc: jours post-conception; jpn: jours post-nataux; NR-DE: Nanoparticles-Rich Diesel Exhaust. Le temps de gestation chez la souris est de 19-21 jours et chez le rat il est d'environ 22 jours. Tableau A.13 | Modèles animaux – Effets sur la descendance à l'âge adulte

Référence	Bolton et al 2014	Mohammad ipour <i>et al</i> 2014	Ghaderi <i>et al</i> 2015	Yokota et al 2015	Cui et al 2014
Résultats	Après régime (cf. Bolton 2012): Forte prise de poids, insulino-résistance et comportement anxieux chez les mâles Pas d'effet chez les femelles Infiltration de macrophages dans le tissu adipeux et le cerveau (mâles et femelles), avec / activation des macrophages chez les mâles. / concentration des marqueurs d'activation microgliale dans l'hippocampe (mâles) Suppression de l'activation des marqueurs des astrocytes (femelles)	Dérégulation de l'apprentissage et la mémoire	Dérégulations du comportement chez les adultes et particulièrement les femelles, touchant la mémoire, l'apprentissage et l'anxiété	Dérégulations de l'apprentissage et de la mémoire associées à une diminution de l'expression de NR2A (N-méthyl-Aspartate récepteur) dans l'hippocampe (mâles)	Comportements de dépression chez l'individu adulte.
Fonction étudiée	Croissance, obésité et fonction neurologique	Fonction neurologique et comportement	Fonction neurologique et comportement	Fonction neurologique et comportement	Fonction neurologique et comportement
Age aux observations (Sexe)	4-5 mois post- nataux	1 et 60 jpn (mâles)	45 à 60 jpn	9-10 semaines post-natales	2 et 40-43 jpn
Polluant (concentration)	DEP en suspension (5оµg dans 5оµL de véhicule)	Nanoparticules de dioxyde de titane (100mg/kg)	Nanoparticules d'argent suspendues dans du citrate de sodium (0.2/2mg/kg)	DEP en suspension (200µg/kg)	Nanoparticules de dioxyde de titane (500µg/individu)
Technique (Effectifs, période et temps d'exposition)	Instillation (7C vs 5E, 2, 5, 8, 11, 14 et 17 jpc, 1 instillation tous les 3 jours)	Gavage oral (6C vs 6E, 2 à 21jpc, 1 gavage par jour)	Injection sous-cutanée (10 femelles gestantes par groupe, 3 jpc à naissance, 1 fois tous les 3 jours)	Injection sous-cutanée (15C vs 15E, à 6, 9, 12, 15 et 18 jpc, 1 injection à tous les 3 jours)	Injection sous-cutanée (8C vs 8E, 6 à 18 jpc, 1 fois tous les 3 jours)
Espèce, lignée	Souris C57BL/6	Rats wistar	Souris NMRI	Souris ICR	Rats Sprague- Dawley

C: Contrôles; DE: Diesel Exhaust; DEP: Diesel Exhaust Particles; E: Exposé; F-DE: Filtered Diesel Exhaust; jpc: jours post-conception; jpn: jours post-nataux; NR-DE: Nanoparticles-Rich Diesel Exhaust. Le temps de gestation chez la souris est de 19-21 jours et chez le rat il est d'environ 22 jours. mâles à avoir des arrêts cardiaques en cas de surcharge de pression en induisant une augmentation du poids corporel et une diminution de la pression artérielle sans changement de la fonction cardiaque (mesurée par échocardiogramme) des descendants adultes à 84 jpn (12 semaines) (Weldy *et al.* 2014).

Chez la souris, une exposition à des concentrations moyennes en DE, affecte la fonction de reproduction femelle avec une diminution de la proportion de follicules primordiaux et primaires chez les femelles adultes à 60 jpn, compromettant leur capacité de reproduction après la puberté (Ogliari et al. 2013). La même exposition au DE perturbe aussi la fonction de reproduction mâle en induisant une augmentation de la concentration sérique en testostérone dans le sérum chez les mâles à 35 jpn (5 semaines). De plus, à 84 jpn (12 semaines), la production journalière de sperme est significativement réduite associée à la présence de cellules géantes multinucléées et une vacuolisation partielle dans les tubes séminifères chez les mâles exposés in utero (Ono et al. 2008). Cette exposition in utero à des concentrations moyennes en DE agirait comme un perturbateur endocrinien de la voie mâle (Ono et al. 2008). L'exposition de la souris à des concentrations moyennes de DE perturbe aussi la locomotion et le comportement des descendants. Elle entraine une réduction de l'activité locomotrice des mâles à 21 jpn (Yokota et al. 2009), explicable par des altérations développementales du système central dopaminergique impliqué dans la motricité, la locomotion et le comportement. En effet, la même exposition altère la coordination motrice et induit un comportement impulsif chez les mâles de 21 à 42 jpn (3 à 6 semaines) (Yokota et al. 2013). D'autre part, l'exposition de souris gravides, à des concentrations moyennes de DE induit une altération des indices d'inflammation à des niveaux différents entre les deux sexes (expression de cytokines pro-inflammatoires et présence de lymphocytes T activés) au niveau des poumons. Les femelles semblent plus sensibles à l'exposition in utero (Sharkhuu *et al.* 2010).

Les descendants adultes de souris exposées *in utero* à de fortes concentrations en DE ont été soumis à un challenge alimentaire pauvre vs riche en gras (Low Fat Diet, LFD : 20% protéines, 70% glucides et 10% lipides vs High Fat Diet, HFD : 20% protéines, 35% glucides et 45% lipides) à 126 jpn (4,5 mois) pendant 6 semaines (Bolton *et al.* 2012). Avant le challenge, à 126 jpn, les mâles exposés au DE *in utero* sont plus lourds et moins actifs (activité locomotrice de base) que les mâles témoins, tandis que les femelles exposées au
DE in utero restent inchangées. Après le challenge HFD, à 168 jpn (6 mois), les femelles exposées ont une prise de poids de 340% supérieur aux femelles témoins, alors que les mâles exposés ont une prise de poids équivalente aux mâles témoins. Cependant, après le challenge HFD, à 168 jpn, les mâles exposés obèses ont une insulinémie plus élevée que les mâles témoins obèses, traduisant une résistance à l'insuline (Bolton et al. 2012). La programmation de la susceptibilité à développer un syndrome métabolique suite à une exposition in utero au DE est dépendante du sexe des descendants. Les effets de l'exposition à des concentrations élevées en DE sur la descendance sont variables. L'exposition maternelle chez la souris peut en effet entrainer une réduction de la production journalière de sperme chez les descendants à 170 jpn, sans avoir d'effet sur le poids corporel, le poids testiculaire et l'expression des gènes impliqués dans la fonction de reproduction mâle ou la fonction endocrine au même âge (Hemmingsen et al. 2009). Cette exposition à de fortes concentrations en DE peut aussi induire une diminution du poids des femelles au sevrage (22 jpn), avec peu d'effets sur la fonction cognitive des femelles et sur les biomarqueurs (e.g., inflammation, toxicité placentaire) de cette exposition à 23-24 jpn (Hougaard et al. 2008).

4.2.3.2. Autres techniques d'exposition

4.2.3.2.1. Instillation

Des souris adultes (4-5 mois) nées de femelles exposées par instillation au DE ont été soumises à un régime obésogène (HFD vs LFD) à 126 jpn (4,5 mois) pendant 6 semaines (Bolton *et al.* 2014). L'exposition prénatale associée au challenge alimentaire à l'âge adulte entraine une forte prise de poids chez les mâles à 168 jpn, supérieure aux mâles témoins obèses, une insulino-résistance et un comportement anxieux, alors que les femelles ne présentent aucun changement lié à l'exposition prénatale. De plus, les mâles et femelles exposés *in utero* et obèses montrent une infiltration de macrophages dans le tissu adipeux et le cerveau, avec une activation plus importante de ces cellules chez les mâles. Enfin, les mâles exposés *in utero* et obèses présentent une concentration élevée des marqueurs d'activation de la microglie/macrophages (*CD11b, Integrin-α-M* et *CX3CR1, Chemokine C-X3-C motif receptor 1*) dans l'hippocampe, signe d'une neuro-inflammation. Les femelles exposées *in utero* et obèses présentent seulement une suppression de l'activation des marqueurs des astrocytes (*GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Bolton *et*

al. 2014). En résumé, l'exposition *in utero* au DE programme la susceptibilité de la descendance à développer des désordres métaboliques, comportementaux et neuro-inflammatoires en réponse à un régime riche, de façon différente entre les sexes. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus après une exposition au DE par inhalation (décrite dans le paragraphe précédent) avec une réponse sexe-spécifique un peu différente où les mâles semblent plus affectés que les femelles (Bolton *et al.* 2012).

4.2.3.2.2. Gavage oral

Une exposition à une faible concentration en nanoparticules de dioxyde de titane par gavage oral de la rate gravide perturbe l'apprentissage et la mémoire des descendants adultes (Mohammadipour *et al.* 2014).

4.2.3.2.3. Injection

Pendant la gestation, des souris ont reçu cinq injections sous-cutanées (1 injection tous les 3 jours) de particules de diesel en suspension équivalant à une exposition à une concentration de 25 μ g/m³ de PM_{2,5} pendant 208 jours (valeurs limites en Europe) (Yokota *et al.* 2015). Cette exposition *in utero* aux particules diesel entraine des perturbations de l'apprentissage et de la mémoire, associées à une diminution de l'expression de NR2A (*N-méthyl-Aspartate receptor* impliqué dans la plasticité synaptique et la fonction de mémoire) dans l'hippocampe du mâle adulte à 63-70 jpn (9-10 semaines) (Yokota *et al.* 2015). Chez le rat, l'exposition gestationnelle à des nanoparticules de dioxyde de titane entraine des comportements de dépression chez l'adulte à 40-43 jpn (Cui *et al.* 2014). Enfin, chez la souris, l'exposition *in utero* à des nanoparticules d'argent entraine des dérégulations du comportement (mémoire, apprentissage et anxiété) chez l'adulte, et plus particulièrement la femelle (Ghaderi *et al.* 2015).

Ainsi, les fonctions les plus atteintes par une exposition *in utero* aux gaz d'échappement de moteur diesel ou aux nanoparticules manufacturées sont la fonction de reproduction mâle et femelle (Watanabe 2005; Ono *et al.* 2008; Hemmingsen *et al.* 2009; Takeda *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2010; Ogliari *et al.* 2013), le système nerveux central et l'inflammation (Ema *et al.* 2013).



Figure A.29 | Schéma expérimental de l'étude de Veras *et al.*, 2008, chez la souris

F : Femelle ; M : Mâle ; Fo, F1 et F2 : générations Fo, F1 et F2 ; T : Témoin ; P : « Pollué » ; TT, PT, TP et PP : la première lettre correspond à l'exposition en période pré-conceptionnelle et la deuxième lettre en période gestationnelle.

Dans cette étude, le modèle utilisé est une exposition continue par inhalation dans des chambres avec air filtré (pour les témoins) ou air non filtré (pollué, provenant de la ville de Sao Paulo). Les souris sont exposées sur 3 générations, la saillie ayant lieu à 60 jpn.

4.2.4. Effets d'une exposition continue sur plusieurs générations

Une étude brésilienne analyse les effets de l'exposition continue de souris sur trois générations (saillie à 60 jpn) par inhalation dans des chambres avec un air filtré (groupe témoin) ou un air non filtré (groupe « pollué » recevant l'air de la ville de Sao Paulo). (**Figure A.29**) (Veras *et al.* 2009). Ainsi, les souris mâles et femelles F2, leurs parents F1 et leurs grands-parents F0 sont exposés à l'air pollué de Sao Paulo en continu, dès leur naissance pour les animaux F0 et dès leur conception pour les animaux F1 et F2.

A 60 jpn, chaque femelle F2 est accouplée à un mâle du même groupe, puis placée dans la chambre témoin ou dans la chambre polluée, aboutissant à 4 groupes d'unités fœto-placentaires F3 à partir de la fécondation : TT (chambre témoin en préconception et en gestation), TP (chambre témoin en préconception et chambre polluée en gestation), PT (chambre polluée en préconception et chambre témoin en gestation) et PP (chambre polluée en préconception et en gestation) (**Figure A.29**)(Veras *et al.* 2008; Veras *et al.* 2009).

Toutes les analyses ont été réalisées sur les femelles F2. Les femelles F2 polluées ont un nombre de follicules antraux réduit (- 36%) à 60 jpn par rapport aux femelles témoins. Le temps de saillie (temps observé entre la mise en cohabitation du mâle et de la femelle et l'apparition du bouchon vaginal, provenant des sécrétions du mâle et qui confirme la saillie) est augmenté, suggérant des altérations de la libido. La fertilité (nombre de femelles gravides sur nombre de femelles saillies multiplié par 100) des femelles F2 polluées est réduite à 60 jpn par rapport aux femelles témoins. Chez les femelles F2 polluées en périodes pré-conceptionnelle et/ou gestationnelle (groupe PP, TP et PT), le nombre de résorptions fœtales augmente, ces pertes atteignant 70% (taux de résorptions fœtales) dans le groupe PP (Veras *et al.* 2009).

Les fœtus F3 des groupes PP, PT et TP sont plus légers de 20% à 18 jpc que les fœtus du groupe TT (Veras *et al.* 2009). De plus, les placentas associés aux fœtus F3 des groupes pollués PP, PT et TP montrent une diminution des volumes, des calibres et des surfaces des espaces sanguins maternels à 18 jpc par rapport aux placentas du groupe TT, ainsi qu'une augmentation de la surface des vaisseaux fœtaux (Veras *et al.* 2008).

4.3. Effets intergénérationnels et transgénérationnels

Très peu d'études se sont intéressées aux effets intergénérationnels et transgénérationnels de l'exposition gestationnelle à des gaz d'échappement de moteur diesel ou à des nanoparticules manufacturées. Cependant, la fonction de reproduction des descendants mâles et femelles est affectée par une exposition in utero à ces polluants. L'exposition in utero à des gaz d'échappement diesel ou des nanoparticules manufacturées modifie différents paramètres de la fonction de reproduction mâle (e.g., stéroïdogenèse, structure des tubes séminifères, production journalière de sperme) et femelle (e.g., diminution du nombre de follicules) (voir §4.2.3) et pourrait avoir des conséquences à long terme et sur plusieurs générations. La période prénatale de développement des cellules germinales est une fenêtre cruciale de la reprogrammation épigénétique (Godfrey et al. 2007; Torano et al. 2016). Les modifications épigénétiques sont influencées par l'environnement et en particulier par l'environnement maternel pendant la gestation. Elles peuvent être transmises aux générations futures (voir §1.3). Des dérégulations épigénétiques, souvent une hyperméthylation des promoteurs de gènes impliquées dans la fonction de reproduction mâle, observées pendant le développement des fœtus mâles F1, suite à l'exposition de la génération F0 à des facteurs/perturbateurs environnementaux, pourraient être transmises à la génération suivante F2 (Rajender et al. 2011).

Dans un modèle de souris gravides Fo exposées à des nanoparticules de dioxyde de titane par inhalation (1h/ jour, entre 8 et 18 jpc, 42 mg/m³) ou à des nanoparticules de carbone suie par instillation intratrachéale (à 7, 10, 15 et 18 jpc, 67 µg/animal/instillation), la production journalière de sperme des descendants mâles F1 est inchangée. Cependant, l'exposition aux nanoparticules de titane tend à diminuer le nombre de spermatozoïdes par gramme de testicule pouvant expliquer la difficulté à obtenir des descendants F2 (augmentation de la durée avant la première portée F2). Enfin, l'exposition aux nanoparticules de carbone suie induit une diminution de la production journalière de sperme des mâles F2, alors que l'exposition aux nanoparticules de titane rinduit pas d'effet sur les paramètres de la fonction de reproduction des mâles F2 (Kyjovska *et al.* 2013).

Il serait donc intéressant d'étudier plus précisément les effets inter- ou transgénérationnels d'une exposition gestationnelle à des polluants atmosphériques ou des nanoparticules manufacturées rencontrées dans l'environnement quotidien.

Différents marqueurs permettent de caractériser l'exposition maternelle à la pollution atmosphérique liée au trafic routier dans les études épidémiologiques. Ces dernières mettent en évidence des effets délétères sur la croissance fœto-placentaire et sur la santé de la naissance à l'âge adulte.

Des modèles animaux ont été développés pour étudier les effets de l'exposition gestationnelle à des gaz d'échappement de moteur diesel ou à des nanoparticules manufacturées retrouvées dans l'environnement quotidien de l'Homme. Les résultats sont parfois contradictoires. Mais les techniques, les durées et les fenêtres d'exposition sont très variables, ainsi que la nature et la concentration des particules utilisées. Cette variabilité complique les comparaisons entre les études. Les gaz d'échappement de moteur diesel et certaines nanoparticules manufacturées produisent les mêmes effets que les perturbateurs endocriniens, ainsi que des effets sur la maturation du système immunitaire, un stress oxydatif dans certains organes et un développement d'obésité chez les descendants, phénotype exacerbé en cas de challenge alimentaire.

Les effets inter- ou transgénérationnels existent, mais ils restent peu étudiés.

5. Transfert transplacentaire des particules

Le transfert transplacentaire des particules dépend de leur taille, de leur composition chimique, ainsi que du type de placentation (voir **§3.1.2**). Différents modèles permettent de déterminer les mécanismes de transfert transplacentaire et les quantités de nanoparticules atteignant le fœtus. Certaines parties de ce chapitre et du précédent sont résumées dans une revue : A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles (**Annexe 1**).

5.1. Taille des particules

La taille des nanoparticules de différentes natures chimiques (*e.g.*, or, polystyrène, silice, *poly*(*lactic-co-glycolic acid*) PLGA) joue un rôle important dans le transfert transplacentaire (Muoth *et al.* 2016).

Les particules PLGA sont utilisées comme des vecteurs de médicaments (Ali *et al.* 2013). Dans un modèle *in vitro* de cellules trophoblastiques humaines (BeWo), la perméabilité des particules PLGA à travers la membrane apicale (côté maternel) vers la membrane basale (côté fœtal) est 25% supérieure pour les particules les plus petites (146 nm de diamètre) comparée aux plus grandes (232 nm de diamètre) (Ali *et al.* 2013). En revanche, l'utilisation de nanoparticules de polystyrène fluorescentes de plus petite taille (50 et 100 nm de diamètre) montre que le diamètre des particules n'influe pas sur leur capacité à traverser le placenta. En effet, les deux types de particules sont retrouvés dans le compartiment basal (fœtal). Cependant, la quantité de particules transférées est plus importante pour les particules de 50 nm de diamètre. Le diamètre des particules n'agit donc pas sur la capacité des particules à traverser le placenta mais sur leur taux de transfert (Cartwright *et al.* 2012).

La taille limite pour laquelle aucun ou un très faible transfert des nanoparticules est observé dépend étroitement de leur nature chimique (Muoth *et al.* 2016). Chez la rate à 18 jours de gestation, les nanoparticules d'or de 1,4 et 18 nm de diamètre injectées par voie intraveineuse traversent le placenta, à l'inverse des nanoparticules d'or de 80 nm (Semmler-Behnke *et al.* 2014). De façon intéressante, chez la rate à 20 jours de gestation, les particules de silicone de plus large diamètre (519 nm) sont retrouvées dans les tissus fœtaux 4h après une injection intraveineuse (Refuerzo *et al.* 2011). Pour les nanoparticules de polystyrène, la valeur seuil pour laquelle le taux de transfert transplacentaire devient

très faible voire nul dépend du modèle d'étude. Dans un modèle *ex vivo* de placenta humain perfusé, le diamètre maximal des particules transférées est de 200 à 300 nm (Wick *et al.* 2010). Dans un modèle *in vitro* de cellules BeWo, cette valeur avoisine les 100 nm de diamètre (Cartwright *et al.* 2012). *A contrario*, dans un modèle *in vivo* de souris recevant une injection intraveineuse de nanoparticules de polystyrène à 17 jours de gestation, il semble ne pas y avoir de valeur seuil. Les particules d'un diamètre de 500 nm sont retrouvées dans les placentas et dans les fœtus 4h après l'injection (Huang *et al.* 2015). La variation importante du diamètre seuil de transfert des nanoparticules suggère que l'épaisseur de tissu placentaire (différant entre les modèles *in vitro*, *ex vivo et in vivo et* entre les espèces souris, rat et Homme) et l'âge gestationnel influent sur leur capacité de transfert, rendant les comparaisons entre les études difficiles. En général, les nanoparticules possédant un diamètre inférieur à 100 nm traversent plus facilement le placenta que les particules ayant un diamètre plus important.

5.2. Charge des particules

La charge positive ou négative de la particule aurait un effet sur sa capacité de transfert transplacentaire. Dans un modèle de placenta humain perfusé, deux types de particules de polystyrène négativement chargées présentent des taux de transferts différents. Les nanoparticules possédant la charge négative la plus faible (potentiel zéta négatif proche de o) ont une capacité de transfert plus élevée que les nanoparticules avec une charge négative élevée (potentiel zéta négatif) (Grafmueller *et al.* 2015).

Dans une étude utilisant des nanoparticules d'or, la modification du *coating* avec un ajout de ferritine, une réaction de pégylation (réaction chimique ajoutant des chaînes de polyéthylène glycol) ou un ajout de citrate affecte la charge des particules. Le potentiel zéta est plus faible pour les particules avec un *coating* de citrate que pour les particules pégylées et les particules avec un *coating* de ferritine. Les nanoparticules avec un *coating* de ferritine possèdent le taux de transfert le plus élevé, tandis que les nanoparticules avec un *coating* de citrate ne traversent que très peu le placenta (Yang *et al.* 2012). Cependant, dans un modèle *in vitro* de cellules BeWo, les particules d'oxydes de fer avec un *coating* d'oléate de sodium et un potentiel zéta très faible sont capables de traverser le placenta alors que les particules d'oxydes de fer lisses ne sont pas retrouvées dans le compartiment basal (Carreira *et al.* 2015). Néanmoins, les particules lisses

d'oxydes de fer semblent s'agglomérer et bloquer les pores de la membrane apicale, rendant la conclusion sur un éventuel effet de la charge difficile. De plus, l'oléate de sodium modifie les caractéristiques hydrophobes des particules. Dans un modèle *in vitro* de cellules BeWo, la charge des particules de polystyrène n'a pas d'effet sur leur capacité de transfert transplacentaire. Cependant, à charge négative équivalente, deux particules dont la composition de la corona diffère ont des capacités de transfert différentes (taux de transfert élevé vs pas de transfert) (Kloet *et al.* 2015).

Bien que les particules de charge positive semblent être plus facilement transférées vers le fœtus que les particules de charge négative, aucune réelle conclusion ne peut être tirée avec la littérature actuelle. Cependant, la charge peut entrainer une modification des caractéristiques physico-chimiques de la corona des particules (*e.g.*, hydrophobie) qui peuvent aussi modifier la translocation des particules (Muoth *et al.* 2016).

5.3. Forme des particules

Le rôle de la forme des particules dans le transfert transplacentaire n'a été que très peu étudié. Certains modèles de cultures cellulaires HeLa (lignée cellulaire cancéreuse) mettent en évidence une absorption cellulaire dépendante de la forme des particules (Chithrani *et al.* 2006). Les cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages sont sensibles à la forme des particules (Muoth *et al.* 2016). Les variations géométriques des particules de silice influencent la voie d'adsorption cellulaire au moment de leur interaction avec la surface cellulaire, suggérant que ces particules aux formes différentes stimulent des voies de signalisation cellulaires spécifiques (Herd *et al.* 2013). Bien que différentes formes de particules soient décrites, comme les nanotubes de carbone ou des particules sphériques de compositions différentes, l'influence de leur forme sur leur transfert transplacentaire reste à clarifier (Muoth *et al.* 2016).

5.4. Absence de transfert transplacentaire des particules

Certaines nanoparticules n'atteignent pas le compartiment fœtal, suggérant l'absence de transfert transplacentaire. Cependant, les techniques de détection des particules dans les tissus placentaires et fœtaux ou dans les liquides physiologiques manquent parfois de sensibilité. La preuve d'absence de transfert est donc difficile à

obtenir (Muoth *et al.* 2016). Chez la souris à 14,5 ou 16-17 jpc, aucune particule n'est observée dans les tissus fœtaux après injection intraveineuse de nanotubes de carbone de 90 nm de longueur (Campagnolo *et al.* 2013) ou de particules d'or de 20 et 49 nm de diamètre (Rattanapinyopituk *et al.* 2014), respectivement. Il en est de même chez la souris après inhalation de particules d'oxyde de cadmium de 11 et 15 nm de diamètre de 4,5 à 16,5 jpc (Blum *et al.* 2012). Enfin, aucun transfert de nanoparticules d'or de 10, 15 et 30 nm de diamètre n'est observé dans un modèle de placenta humain perfusé (Myllynen *et al.* 2008).

La capacité de transfert transplacentaire des nanoparticules dépend donc de leur taille, de leur charge et probablement de leur forme. Elle varie aussi selon le mode de contamination de l'organisme.

5.5. Mécanismes de transfert transplacentaire des particules

Les mécanismes de transfert transplacentaire des particules sont encore très peu connus. La plupart des études s'intéresse à la capacité de transfert des particules selon leur forme, leur taille ou leur charge (voir **A§5.1, 5.2 et 5.3**), mais les mécanismes d'entrée dans la cellule trophoblastique sont très rarement étudiés.

Le transport transplacentaire implique différentes voies comme la diffusion simple ou facilitée, le transport actif ou l'endocytose (voir **A§3**). La taille des pores des placentas hémochoriaux est de 10 nm de diamètre (Challier 1989). Les particules de diamètre inférieur à 10 nm peuvent donc traverser le placenta par diffusion simple. L'endocytose est un des mécanismes proposés pour le transfert transplacentaire de nanoparticules d'or (Rattanapinyopituk *et al.* 2014).

L'étude détaillée du type de mécanisme d'entrée dans la cellule selon la taille, la charge et la composition chimique de la particule étudiée, permettrait de mieux comprendre leur toxicité au niveau cellulaire.

Différents modèles *in vivo, ex vivo* et *in vitro* ont été développés pour étudier le transfert transplacentaire des nanoparticules et leur capacité à atteindre les organes fœtaux. Les nanoparticules peuvent en effet s'accumuler dans le placenta, le traverser et atteindre le fœtus. Leur capacité de transfert transplacentaire dépend de leur taille, de leur charge et probablement de leur forme, ainsi que du type de placentation, de l'épaisseur de la barrière interhémale et de l'âge gestationnel.

6. Objectifs de la thèse

Lors de pics de pollution dans les grandes villes, les femmes enceintes ne sont pas toujours considérées comme personnes fragiles au même titre que les enfants, les personnes âgées et les asthmatiques. Cependant, le développement fœtal est une fenêtre de plasticité des tissus aux stimuli environnementaux. Une exposition *in utero* peut amplifier la susceptibilité de développer des pathologies respiratoires, métaboliques ou cardiovasculaires à l'âge adulte.

Cette thèse a été effectuée dans le cadre d'un projet de plus grande envergure financé par des fonds européens (European Research Council et Agence Nationale de la Recherche) dont l'objectif était d'évaluer les effets d'une exposition maternelle pendant la gestation aux gaz d'échappement de moteur diesel sur le développement embryonnaire, fœto-placentaire et post-natal ainsi que les effets intergénérationnels.

Au sein de ce projet, le but de cette thèse est d'explorer les effets d'une exposition gestationnelle au gaz d'échappement de moteur diesel, composant majeur de la pollution atmosphérique, riche en nanoparticules, à des concentrations proches de celles auxquelles les populations urbaines sont exposées en Europe, sur le développement fœto-placentaire de la première et la deuxième génération, dans un modèle lapin.

Trois objectifs distincts ont été poursuivis :

1/ Evaluation des effets d'une exposition maternelle sur la **biométrie fœtoplacentaire** et la **fonction placentaire en fin de gestation de la première génération**

2/ Evaluation des effets sur la biométrie fœto-placentaire et la fonction placentaire en fin de gestation de la deuxième génération

3/ Analyse et interprétation de ces résultats en prenant en compte les autres analyses faites sur le même modèle dans l'ensemble du projet

A des fins de publication, les objectifs ont été en partie confondus dans les articles issus de ce travail. Ainsi, dans la suite de cette thèse, nous présenterons d'abord :

- Dans la Partie B, les matériels et méthodes utilisés pour le suivi et l'analyse de croissance fœto-placentaire des deux générations ainsi que pour les paramètres biologiques suivis chez les femelles gravides et les fœtus des différentes générations.
- Dans la **Partie C**, les résultats sous la forme de :

1/ Article publié dans *Particle and Fibre Toxicology* (DOI 10.1186/s12989-016-0151-7) présentant la croissance fœto-placentaire de 7 à 28 jpc et la vascularisation placentaire de la première génération ainsi que la biométrie fœto-placentaire et le métabolisme fœtal de la deuxième génération.

2/ Résultats complémentaires sur la première génération : profils en acides gras des plasmas et placentas de la première génération (F0 et F1) ainsi qu'une analyse fonctionnelle des placentas de la première génération.

3/ Article en préparation pour une soumission prévue dans PLOS One sur la caractérisation (structure et fonction) des placentas de la deuxième génération et l'analyse des profils en acides gras.

Partie B

Matériels et méthodes

Poids moyen (adulte): 2 à 5 kg Espérance de vie: 3 à 5 ans Puberté: 12 à 14 semaines Maturité sexuelle: 17 semaines Durée de gestation: 31 à 32 jours Taille de portée: 7 à 12 lapereaux

Encart B.1 | Principales caractéristiques du modèle lapin



Figure B.1 | Evènements majeurs de la différenciation gonadique dans trois espèces d'intérêt Contrairement à la femme, la maturation des gamètes de la lapine (début de la méiose) commence après la naissance. D'après (Monniaux *et al.* 2009)(Daniel-Carlier *et al.* 2013). jpc: jours post-conception ; jpn : jours post-nataux ; SA : semaines d'aménorrhée

Partie B : Matériels et méthodes

1. Expérimentation animale

L'ensemble de ces travaux a été approuvé par le comité d'éthique local (N°45 dans le registre national français) sous le numéro 12/102. Les lapines ont été hébergées dans les locaux de l'UCEA (Unité Commune d'Expérimentation Animale) sur le site INRA de Jouyen-Josas.

1.1. Choix du modèle animal – le lapin

Le lapin appartient à la famille des lagomorphes. Les caractéristiques majeures de cet animal sont présentées dans l'**Encart B.1**. En Europe, il est le 3^{ème} modèle biomédical utilisé dans les laboratoires (2,78%) après la souris (59,3%) et le rat (17,7%) (Européenne 2010). Le lapin est plus souvent utilisé pour des tests toxicologiques (cosmétiques ou pharmacologiques) ou comme modèle biomédical pour des pathologies cardiovasculaires, du métabolisme lipidique, pour l'électrophysiologie cardiaque ou encore certaines tumeurs.

Pour cette étude, le lapin a été choisi pour les nombreux avantages physiologiques qu'il présente. Son placenta est de type hémodichorial, ce qui le rend plus proche du placenta humain que ceux des modèles rongeurs (Fischer et al. 2012; Furukawa et al. 2014). Il possède une taille adéquate pour réaliser un suivi échographique de la croissance fœto-placentaire, grâce aux mêmes outils échographiques que ceux utilisés en clinique humaine et en utilisant les mêmes paramètres que pour le fœtus humain. Sa période intergénérationnelle courte permet d'analyser les effets intergénérationnels d'une exposition gestationnelle. Son métabolisme lipidique est proche de celui de l'homme avec une majorité de lipoprotéines LDL circulantes alors que ce sont les HDL qui sont majoritaires chez les rongeurs. Son embryon de grande taille permet de disséquer l'embryoblaste du trophoblaste. De plus, le lapin possède des homologies de séquence avec l'homme et des outils de transcriptomique sont disponibles pour l'analyse haut débit de l'expression génique dans nos tissus d'intérêt. La différence majeure avec l'homme est que la méiose des tissus gonadiques se déroule après la naissance à l'inverse de l'homme (Figure B.1.) (Monniaux et al. 2009; Daniel-Carlier et al. 2013). Cependant, le lapin est un animal très sensible au stress, paramètre dont il a fallu tenir compte au cours de

l'expérimentation animale. De plus, contrairement à l'homme, la lapine donne naissance à une portée de 7 à 12 fœtus alors que la femme n'a qu'un ou deux enfants par grossesse. Enfin, la gestation de la lapine (30-32 jours) est très courte, plus longue que celle des rongeurs, mais largement inférieure aux neuf mois de grossesse chez la femme.

1.2. Exposition par inhalation

Cette partie présente en détail le protocole d'exposition des lapines.

Le schéma complet du protocole expérimental est représenté par la Figure B.2 (voir B§1.3).

1.2.1. Expériences préliminaires et mise en place de l'expérimentation

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer le temps optimal d'exposition sans créer d'épisode de stress, mesuré en dosant le cortisol, ou d'augmentation trop importante de température corporelle des lapines. Ces expérimentations ont permis de définir le temps maximal d'exposition à une heure, répétable deux fois par jour et la nécessité d'habituer les lapines à entrer et rester dans les dispositifs d'exposition. Ces expériences ont fait l'objet du stage de Master 1 de Pauline HOARAU encadrée par Christophe RICHARD.

La première partie de l'expérimentation a consisté à sélectionner les lapines et les entrainer à être manipulées quotidiennement, puis à entrer dans les dispositifs, à y rester un temps croissant (de 5 minutes jusqu'à 1h) (**Figure B.3.**). Parallèlement à ces manipulations, les lapines ont été habituées aux niveaux de nuisances sonores de l'appareil d'exposition sous forme d'un enregistrement passé dans la cellule deux fois par jour (**Figure B.4.**). La dernière semaine avant le début des expérimentations, les lapines ont été habituées à recevoir un flux d'air au niveau du museau, grâce à un petit module d'exposition (**Figure B.5.**). J'ai réalisé cette sélection des lapines et leur phase d'habituation avec l'aide technique de Michèle DAHIREL.

J'ai réparti les lapines dans les deux lots d'expérimentation selon leur poids afin d'obtenir une médiane de poids équivalente dans les deux groupes.

Les lapines ont été saillies par des mâles témoins de la lapinerie. La programmation des saillies a été réalisée à l'initiation du projet par Eve MOURIER et Pascale CHAVATTE-PALMER.



Figure B.2 | Expérimentation animale

Les lapines Fo (5 témoins et 7 exposées) sont exposées par inhalation « nose-only » soit à de l'air filtré pour les témoins, soit à des gaz d'échappement de moteur diesel pour les exposées. Elles sont exposées 2h par jour et 5 jours par semaine. La concentration en nanoparticules est de 1 mg/m³ et leur diamètre moyen est de 69 nm. A 28 jpc, un premier lot de lapines est euthanasié et les unités fœto-placentaires sont collectées. Un autre lot de lapines Fo donne naissance à la génération F1. Une fois adulte, les femelles F1 âgées de 6,5 mois sont mises à la reproduction avec des mâles de l'élevage afin de générer les animaux F2. Les unités fœto-placentaires F2 sont collectées à 28 jpc dans les mêmes conditions que les unités F1.

F0: Génération F0; F1: Génération F1; F2: Génération F2; jpc: jours post-conception.



Figure B.3 | Présentation des dispositifs de contention pour l'exposition

Les tubes ont été créés spécialement pour cette expérimentation. Ils sont en plexiglas avec un fond en aluminium sous lequel un réservoir collecte les urines des lapines. Une fois la lapine dans le tube, un morceau de plexiglas est placé à l'arrière du tube afin que la lapine ne puisse pas reculer pendant l'exposition. Enfin une plaque d'aluminium clôture la fermeture du tube.



Figure B.4 | Présentation de la salle d'hébergement des lapines à l'INRA de Jouyen-Josas

Cette photographie représente une cellule contenant 72 cages individuelles dans lesquelles évoluent les lapines. Pour l'enrichissement, les cages possèdent une plateforme. La distribution de la nourriture est individuelle.



Figure B.5 | Habituation des lapines au flux d'air Les lapines sont habituées à recevoir un flux d'air pendant 15 minutes la dernière semaine (5 jours) avant le début des expérimentations.



Figure B.6 | Schéma de fonctionnement du MAPCEL

DE: gaz d'échappement de moteur diesel; KVA: Kilovoltampère.

Le moteur qui génère les gaz d'échappement diesel possède un filtre à particules. Le flux de gaz d'échappement de moteur diesel est réduit puis mélangé à de l'air purifié. La concentration en particules est contrôlée et maintenue à la valeur souhaitée. Plusieurs appareils connectés au flux de gaz d'échappement dilués ont permis la mesure de la concentration en gaz (oxydes d'azote, monoxyde et dioxyde de carbone) et le contrôle de la température ($21-23^{\circ}C$) et de l'humidité relative ($40-45^{\circ}$).

1.2.2. Matériels et technique d'exposition

Le matériel d'exposition a été apporté par l'équipe de Flemming CASSEE du National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Il s'agit d'un laboratoire mobile MAPCEL (Mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory) connecté à un moteur diesel 25KVA de l'entreprise Loxam, moteur de référence pour l'équipe du RIVM (**Figure B.6.**). Ce moteur est équipé d'un filtre à particules permettant l'émission de particules possédant un diamètre inférieur à 500 nm. Le flux de gaz d'échappement de moteur diesel est réduit puis mélangé à de l'air purifié. La concentration en particules est contrôlée et maintenue à la valeur souhaitée grâce à la maîtrise du flux d'air. Plusieurs appareils connectés au flux de gaz d'échappement dilué ont permis la mesure de la concentration en gaz (NO_x, CO et CO₂), le contrôle de la température (21-23°C) et de l'humidité relative (40-45%). Paul FOKKENS et John BOERE, du RIVM, se sont relayés au cours des deux mois d'expérimentation pour gérer les paramètres d'exposition et de mesure du MAPCEL.

Pendant l'expérimentation, les lapines ont été exposées deux heures par jour, une heure le matin et une heure l'après-midi, cinq jours par semaine. Cette exposition a été effectuée du 3^{ème} au 27^{ème} jour de gestation (jpc) (**Figure B.2.**). L'exposition a débuté à 3 jpc afin de ne pas perturber l'ovulation induite par la saillie et le développement embryonnaire précoce dans cette espèce très sensible au stress. Sur les conseils d'un collègue travaillant sur les comportements réflexes chez le lapin avec un système de contention un peu similaire, il a été décidé de distraire les lapines au cours de l'exposition en installant des lumières colorées clignotantes et de la musique. Michèle DAHIREL et Etienne AUJEAN étaient responsables de la mise en place des lapines dans les dispositifs à chaque exposition puis de leur retour en salle de stabulation de la lapinerie; je les remplaçais lorsque c'était nécessaire. Pendant les heures d'exposition, les lapines étaient surveillées pour pouvoir intervenir immédiatement en cas de nécessité. Je me suis occupée de surveiller les lapines témoins et Jérôme DORIVAL (stagiaire de Master 2) ou un autre membre de l'équipe surveillait les lapines du groupe exposé avec Paul FOKKENS ou John BOERE (RIVM).

Les lapines ont été exposées à de l'air extérieur filtré pour les témoins et à des gaz d'échappement de moteur diesel filtrés et dilués pour celles du groupe exposé avec une concentration en particules maintenue à 1 mg/m³ et les particules présentes avec un
diamètre inférieur à 500 nm, permettant d'obtenir un gaz contenant majoritairement des nanoparticules avec un diamètre moyen de 69 nm. La concentration moyenne journalière en particules est de $80\mu g/m^3$ durant 20 jours au cours de la gestation. Cette exposition correspond à une exposition quotidienne à un pic de pollution dans les grandes villes européennes, avec une concentration moyenne quotidienne largement supérieure aux normes recommandées par l'OMS, qui s'élève pour les PM_{2,5} à $30\mu g/m^3$ pour le seuil de recommandation et à 50 $\mu g/m^3$ pour le seuil d'alerte (voir §2.4.1).

1.3. Protocole expérimental – Deux générations

Les lapines ont été réparties dans 3 séries. Une première série de lapines a été utilisée pour l'analyse du développement embryonnaire avec des collectes d'embryons à 6 jpc. Une deuxième série de lapines a été suivie par échographies pendant la gestation et abattue quelques jours avant le terme (à 28jpc) pour le suivi de la croissance fœtoplacentaire des F1, le développement des glandes mammaires F0 et des gonades fœtales, c'est cette série que j'ai particulièrement suivie pendant cette thèse. Enfin, une troisième série de lapines a donné naissance à la génération F1 qui a été suivie de la puberté jusqu'à l'âge adulte, ce volet du projet EPAPP a fait l'objet du stage de Master 2 de Pauline HOARAU, sous la direction de Delphine RALLIARD-ROUSSEAU, en 2014. J'ai participé au suivi des individus jusqu'au sevrage. Une fois adulte, une partie des femelles F1 a été mise à la reproduction pour explorer le développement fœto-placentaire de la génération F2, ce dernier volet est une partie du projet qui s'intègre également dans cette thèse.

Pour la série de lapines utilisée pour le suivi du développement fœto-placentaire F1, les lapines ont été suivies par échographies au cours de la gestation (voir §2.1.). A 28 jpc, les lapines ont été anesthésiées afin de réaliser une dernière série de mesures échographiques des fœtus et de leur placenta directement au contact de l'utérus *ex vivo*, technique développée dans le paragraphe suivant (voir §2.1.). Enfin, elles ont été euthanasiées (voir §2.2) après la collecte des unités fœto-placentaires dont les analyses sont développées dans les parties §2.2 et 3 (Figure B.2.).

L'autre série de lapines Fo (n=7 témoins et n=9 exposées) exposées de la même façon a donné naissance à la génération F1. Les animaux F1, mâles et femelles, ont été sevrés à l'âge de cinq semaines. Au moment du sevrage, une épidémie de diarrhée a décimé un grand nombre d'individus des deux sexes et dans les deux groupes. Les

animaux malades ont été soignés dès l'apparition des premiers symptômes (Flagyl© et Smecta©, Baytril© et Sodigest©) et des traitements antibiotiques préventifs (Trisulmix© dans l'eau de boisson) ont été mis en place pour les animaux ne présentant pas encore de symptômes et pour les lapereaux non sevrés. Le taux de perte des animaux s'est élevé à 55% chez les témoins et 41% chez les pollués. Cet aléa expérimental nous a empêché d'évaluer les effets de la pollution au sevrage, stade auquel nous avions prévu de sacrifier la moitié des animaux et des prélèvements dans le cadre du programme EPAPP. Un suivi physiologique a été réalisé sur les animaux survivants, soit au total 72 lapins (tous sexe et groupes confondus) par Delphine RALLIARD-ROUSSEAU jusqu'à l'âge adulte de 7,5 mois. Un suivi de poids, des mesures de tension artérielle (à 4,5 et 7 mois), une analyse de la composition corporelle (IDEXA à 5 mois) et des prélèvements de sang pour des analyses de biochimie sanguine (à 4,5 et 7,5 mois) ont été réalisés chez les animaux F1. Les femelles F1 ont ensuite été mises à la reproduction avec des mâles non exposés de l'élevage afin de produire une génération F2. Ces femelles F1 gravides n'ont pas été suivies par échographie, seul un diagnostic de gestation a été réalisé à 7 jpc. Ces lapines F1 gravides (n=3 témoins et n=9 exposées) ont été euthanasiées à 28 jpc. Les euthanasies des lapines gravides F1 ont été réalisées par électronarcose et saignement, les dissections des lapines et des unités fœto-placentaires F2 ont été réalisées dans les mêmes conditions que la génération Fo (voir §2.2).

2. Suivi de la croissance fœto-placentaire

2.1. Echographies

Au cours de la gestation, les lapines ont été échographiées à 7, 14, 21 et 28 jpc. Toutes les échographies ont été réalisées par Eve MOURIER et Christophe RICHARD.

A 7, 14 et 21 jpc, les échographies ont été réalisées à la lapinerie avec un échographe Voluson E8 (GE Medical Systems) et une sonde linéaire volumique de 6-18 MHz (RSP6-16). Les lapines ont été échographiées dans une salle d'expérimentation maintenue dans la semi-obscurité, pour cela, elles ont été enveloppées (tête, thorax et membres antérieurs) dans des alèses puis retournées délicatement sur le dos et maintenues par un second expérimentateur. Cette position permet d'éviter le stress et l'agitation de la lapine pendant la séance d'échographie, qui dure 30 minutes en moyenne. Une fois en décubitus dorsal, l'abdomen de la lapine a été tondu puis cette



Figure B.7 | Echographies d'un conceptus de lapin à 7, 14, 21 et 28 jpc grâce à un échographe Voluson[®] 7 jpc : diamètres D1 et D2 et périmètre des embryons (A).

14 jpc : longueur et largeur de la tête (B), longueur et largeur du corps (C) et pouls (aorte fœtale) (D).
21 jpc : longueur de la tête (flèche rose) et diamètre bipariétal (flèche bleue) (E), périmètre abdominal (F).
Pouls et indices de résistance et de pulsatilité (artère ombilicale) (G)

28 jpc : Laparotomie avec extériorisation des cornes utérines (contact direct sonde/paroi utérine) (**H**), pouls et indices de pulsatilité et de résistance et vélocités systoliques et diastoliques (artère ombilicale, **I** et artère cérébrale, **J**). Reconstruction en 3D des placentas (**K**) : volume, gris moyen et indices de densité vasculaire (VI), intensité de flux sanguin (FI) et indice VFI représentant la perfusion sanguine placentaire.

zone a été humidifiée afin d'améliorer le passage des ultrasons et ainsi la qualité de l'image. Après le dépôt de gel de contact échographique, l'expérimentateur a effectué les mesures des conceptus (embryons ou fœtus et placentas selon le stade).

A 7 jpc, une ellipse a été dessinée sur le pourtour de l'embryon et les diamètres (D1 et D2 correspondant à un grand et un petit diamètre) ainsi que le périmètre des embryons ont été mesurés (**Figure B.7**).

A 14 jpc, la longueur et la largeur du corps, la longueur et la largeur de la tête ainsi que le pouls au niveau de l'aorte fœtale ont été mesurés (**Figure B.7**).

A 21 jpc, le périmètre abdominal, la longueur du fémur, la longueur de la tête ainsi que le diamètre bipariétal et la pulsatilité ombilicale ont été mesurés sur les fœtus. De plus, des indices de pulsatilité et de résistance ainsi que des vélocités systoliques (VS), diastoliques (VD) et le rapport des deux ont été mesurés au niveau de l'artère ombilicale (**Figure B.7**). L'indice de pulsatilité est le rapport (VS-VD)/VS et l'indice de résistance représente VS-VD/vitesse moyenne. Le volume et le gris moyen des placentas ont aussi été estimés. Le gris moyen représente la densité du tissu.

A 28 jpc, les lapines ont été anesthésiées par l'injection d'un mélange anesthésique constitué de 0,1 mL de Domitor© (anesthésique), 0,1 mL de Torbugesic© (analgésique) et 0,3 mL d'Imalgène© (anesthésique). Les lapines ont été maintenues endormies par inhalation d'isoflurane à 5% les premières minutes puis à 2% jusqu'à l'euthanasie, grâce à une intubation. Une laparotomie a été réalisée et les cornes utérines ont été extériorisées afin de pratiquer une échographie à même la paroi utérine pour obtenir des mesures très précises des flux sanguins fœtaux et placentaires (**Figure B.7**). Sur les fœtus, le pouls, les indices de pulsatilité et de résistance ainsi que les vélocités systoliques, diastoliques et le rapport des deux ont été mesurés au niveau de l'artère ombilicale et de l'artère cérébrale (**Figure B.7**). Sur les placentas, le volume, le gris moyen (valeur représentative de la densité du tissu) et des indices de densité vasculaire (VI : Vascularization Index), d'intensité de flux sanguin (FI : Flow Index) et un indice VFI qui est une combinaison des deux premiers et qui représente la perfusion sanguine placentaire (VFI : Vascularization Flow Index) ont été mesurés.



Figure B.8 | Mesures biométriques fœtales à 28 jpc

La longueur de la tête (**a**) et le diamètre bipariétal (**b**) sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse numérique. Le périmètre abdominal (**c**) est mesuré à l'aide d'une ficelle et d'une règle. Les fœtus sont pesés, déposés sur une feuille de papier millimétré et pris en photo afin de réaliser une analyse *a posteriori* la longueur du corps (**d**) grâce au logiciel Image J[®].



Figure B.9 | Dissections des unités fœto-placentaires à 28jpc Les euthanasies et les dissections ont nécessité la contribution de l'ensemble de l'équipe ER4 PEPPS (Placenta-Environnement et Programmation des PhénotypeS).

2.2. Biométrie fœto-placentaire à 28 jpc

A 28 jpc, les unités fœto-placentaires F1 (n=41 témoins et n=68 exposées) ont été collectées dans un ordre défini de l'ovaire gauche à l'ovaire droit, leur position dans la corne a été notée, puis les membranes amniotiques ont été éliminées et les fœtus ont été prélevés puis séparés de leurs placentas. Les fœtus ont été pesés, déposés sur une feuille de papier millimétré et pris en photo afin de mesurer la longueur du corps *a* posteriori grâce au logiciel Image J (Figure B.8). Puis ils ont été décapités afin de collecter les échantillons sanguins pour les différents dosages (voir §2.3.). Ensuite, la longueur de la tête et le diamètre bipariétal ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse numérique (Figure B.8). Le périmètre abdominal a été mesuré au niveau de l'insertion du cordon ombilical à l'aide d'une ficelle et d'une règle (Figure B.8). Une fois ces mesures réalisées, les fœtus ont été disséqués afin de collecter le cerveau, les poumons, le cœur, le foie, la rate, les reins, les glandes surrénales et les gonades. Tous les organes ont été pesés exceptés la rate, les glandes surrénales et les gonades. Les placentas ont été pesés entiers puis la zone labyrinthique d'origine fœtale, zone d'échanges entre le sang maternel et fœtal, a été séparée de la décidue d'origine maternelle. La zone labyrinthique et la décidue ont été pesées séparément.

A 28 jpc, une fois les unités fœto-placentaires prélevées, les lapines F0 ont été euthanasiées par une injection intracardiaque de 5 mL de Dolethal©. Les lapines ont été disséquées afin de collecter le cerveau, les poumons, le cœur, le foie, la rate, les reins, les glandes surrénales et les ovaires. De plus, des échantillons de sang ont été prélevés afin de réaliser différents dosages métaboliques.

Les euthanasies et les dissections ont nécessité la contribution de l'ensemble de l'équipe ER4 PEPPS (Placenta-Environnement et Programmation des PhénotypeS) (**Figure B.9**). Dans ce travail, j'ai réalisé la totalité des mesures sur les fœtus, et j'ai participé aux dissections des lapines, des fœtus et des placentas.

3. Le placenta

3.1. Structure et ultrastructure placentaires

Un fragment de zone labyrinthique et un fragment de décidue ont été fixés en Formol 4%, puis conservés en tampon phosphate salin à 4°C. Après inclusion en paraffine, des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Leica



Figure B.10 | Histologie et stéréologie sur les placentas de lapin à 28 jpc

Photographie (x 17) d'une coupe transversale de placenta de lapin à 28 jpc colorée en hématoxyline/éosine (**A**) et un agrandissement (x 62) de la zone labyrinthique (**B**). Photographie (x 22) d'une coupe de placenta de lapin à 28 jpc marquée par immunohistochimie contre la vimentine (**C**) et un agrandissement de la structure de la zone labyrinthique (x 69) (**D**). Schéma d'une analyse en stéréologie avec un dipôle représenté par la flèche rouge et chaque entrée du dipôle dans une nouvelle structure tissulaire (Trophoblaste, Espace Sanguin Maternel, Vaisseaux Fœtaux) par une croix bleue (**E**).

VF: Vaisseau Fœtal; T: Trophoblaste; ESM: Espace Sanguin Maternel.

microtome, Allemagne). Une partie des coupes a ensuite été colorée à l'Hématoxyline/Eosine, puis scannée au Nanozoomer (Nanozoomer Digital Pathology System, Hamamatsu, Japon) afin de réaliser une première analyse microscopique (**Figure B.10**). L'inclusion en paraffine et les coupes ont été réalisées par Marie-Sylvie LALLEMAND, j'ai appris à maitriser ces techniques. Les colorations en hématoxyline/éosine ont été réalisées par Abdelhak BOUKADIRI sur la plateforme d'histologie du centre INRA de Jouy-en-Josas.

Pour les zones labyrinthiques, des immunohistochimies avec un anticorps antivimentine, protéine du cytosquelette, ont été effectuées afin de pouvoir distinguer les vaisseaux fœtaux des espaces sanguins maternels (**Figure B.10**). Les lames ont ensuite été scannées au Nanozoomer. Ensuite, une analyse stéréologique avec le module One Step Stereology du logiciel Mercator (Explora Nova, Hamamatsu, Japon) a été réalisée. La stéréologie consiste en l'évaluation quantitative (nombre, longueur, surface ou volume) des structures en trois dimensions à partir d'une coupe en deux dimensions (Favaron et *al.* 2013). Afin de caractériser ces structures, une trentaine de sondes (« dipôles ») ont été envoyées aléatoirement sur la zone d'intérêt puis pour chaque dipôle l'entrée de la sonde dans chaque nouvelle structure a été indiquée (**Figure B.10**). Dans cette étude, la structure et le volume relatifs des vaisseaux fœtaux, du trophoblaste, des espaces sanguins maternels et des cellules circulantes ont été mesurés. J'ai réalisé la totalité des marquages immunohistochimiques et toutes les analyses stéréologiques placentaires.

Pour les analyses ultrastructurales, de petits fragments de zones labyrinthiques (2 mm x 2 mm) ont été fixés en Glutaraldéhyde 4% toute une nuit puis lavés trois fois en tampon cacodylate de sodium avant d'être inclus en résine Epon. Des coupes semi-fines de 0,5 µm d'épaisseur ont été colorées avec du Bleu de Toluidine puis analysées au microscope Olympus. Des coupes ultrafines de 75 nm d'épaisseur ont été contrastées avec du citrate de plomb et analysées avec un microscope électronique à transmission (Zeiss EM902 EELS) (**Figure B.11**). J'ai réalisé les lavages avant l'inclusion, participé à l'inclusion des échantillons, la majorité des inclusions a cependant été réalisée par Marie-Christine AUBRIERE. Toutes les coupes et analyses en microscopie électronique à transmission ont été effectuées par Josiane AIOUN. J'ai également été formée aux coupes et à l'analyse des images de microscopie électronique.



Figure B.11 | Photographie d'une coupe ultrafine d'un placenta de lapin à 28 jpc Cette image a été réalisé par Josiane AIOUN. Les coupes ultrafines (75 nm) sont contrastées avec du citrate de plomb.

T1 : Cellule trophoblastique 1 ; T2 : Cellule trophoblastique 2 ; VF : Vaisseau Fœtal ; ESM : Espace Sanguin Maternel ; H : Hématies ; CE : Cellule endothéliale.

3.2. Expression génique placentaire

Les analyses présentées dans ce paragraphe ont été réalisées de façon identique pour les placentas F1 et F2.

Des échantillons de zones labyrinthiques ont été congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C. Les ARN totaux des placentas sélectionnés aléatoirement (10 mâles et 10 femelles par groupe pour les F1 et 4 mâles et 4 femelles par groupe pour les F2) ont été extraits en solution D (Chomczynski & Sacchi 1987), puis transformés en ADN complémentaire grâce à une transcription inverse (RT: Reverse Transcription), purifiés avec un kit Qiagen (RNeasy Mini kit, Qiagen) et leur qualité a été mesurée grâce à un bioanalyser (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Allemagne). Ensuite, les échantillons ont été amplifiés et marqués avec un kit Agilent (One color Microarray-based Gene Expression Analysis low input Quick Amp labeling, Agilent and One color spike mix, Agilent) puis hybridés sur une puce Agilent (G4102A-AMADID 042421) dessinée par Véronique DURANTHON et ses collaborateurs (Jacquier et al. 2015). Cette puce permet l'analyse de 12775 gènes. Plusieurs gènes ont été analysé en RT-qPCR afin de valider cette analyse haut débit qu'est la transcriptomique, les primers dessinés pour cette expérience sont présent dans le Tableau Annexe 2. J'ai réalisé les extractions et transcriptions inverses, puis avec l'aide et sous la supervision de Catherine ARCHILLA, nous avons réalisé les marquages, enfin les hybridations sur les puces ont été réalisées par Jérôme LECARDONNEL au CRB GADIE (Centre de Ressources Biologiques pour la Génomique des Animaux Domestiques et d'Intérêt Economique) sur le site de Jouy-en-Josas. J'ai ensuite réalisé la sélection des gènes candidats pour la vérification (grâce aux analyses GSEA décrites ci-après), puis le dessin des primers associés et enfin toutes les RT-qPCR sur les échantillons placentaires sélectionnés.

Les analyses bioinformatiques des signaux ont été réalisées dans un premier temps par Luc JOUNEAU à l'aide du package limma où les p-values et les FDR (*False Discovery Rate*) ont été calculés afin d'estimer les différentiels d'expressions génique placentaires. Dans un deuxième temps, avec l'aide de Véronique DURANTHON, Catherine ARCHILLA et Luc JOUNEAU, j'ai réalisé des analyses complémentaires avec l'application GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*). L'approche conventionnelle basée sur une analyse gène par gène devient inefficace pour des effets subtils car elle fait l'usage d'une fraction mineure de l'information contenue dans l'ensemble des données de transcriptomique.

GSEA cartographie les transcrits dans les voies de signalisation connues ou réseaux de gènes issus des bases de données choisies pour permettre l'analyse de milliers de transcrits potentiellement impliqués dans la régulation de voies spécifiques sans perte d'information. Dans cette étude, GSEA a été utilisé afin d'identifier l'enrichissement des réseaux de gènes associés à l'exposition gestationnelle aux gaz d'échappement de moteur diesel. Les analyses GSEA ont été réalisées avec les paramètres suivants : 1000 permutations sur les réseaux de gènes ou le phénotype (Témoin versus Exposé) en fonction du nombre d'échantillons analysés (40 échantillons en F1 et 16 en F2). L'enrichissement d'une voie de signalisation a été considéré significatif lorsque la q-value (ajustée par FDR) était strictement inférieure à 0,25. Pour ces analyses, quatre bases de données, présentant des voies de signalisation/réseaux de gènes, ont été utilisées : la base C2:KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) et les bases GO C5:BP (Biological Process), C5:CC (Cellular Component) et C5:MF (Molecular Function) (de Tayrac et al. 2009). Ces bases ont été choisies car leur analyse individuelle permet d'avoir une puissance suffisante, elles apportent des informations précises sur un grand nombre de fonctions biologiques et se complètent les unes les autres.

4. Métabolisme maternel et fœtal

Plusieurs paramètres sanguins, cités dans les paragraphes ci-dessous, ont été analysés afin d'observer une éventuelle dérégulation métabolique de l'exposition de la génération Fo.

La biochimie sanguine des lapines de la génération Fo a été évaluée grâce à un M-Scan II (Melet Schloesing laboratoires, France) par Christophe RICHARD. Ces analyses comprennent la glycémie et les concentrations plasmatiques en insuline, triglycérides, aspartate aminotransférase (ASAT), créatinine et urée.

La biochimie sanguine des fœtus F1, des lapines adultes F1 et des fœtus F2 a été réalisée à l'Hôpital Européen Georges Pompidou (AP-HP HEGP) dans le laboratoire de Biochimie de l'UF Cardio-Vasculaire par Natalie FOURNIER (MC PH, Faculté de Pharmacie, Université Paris Saclay). La glycémie et les concentrations plasmatiques en insuline, en cholestérol total, cholestérol non-HDL, HDL cholestérol, triglycérides, aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), créatinine et urée ont été dosés grâce à un équipement Beckman Coulter.

J'ai complété ces dosages par un dosage ELISA de l'IGF-1. Chez les fœtus F1, ce dosage supplémentaire a été réalisé car il a été montré que chez le rat, la concentration plasmatique fœtale en IGF-1 semble varier avec l'insulinémie (Hill & Milner 1985). La concentration plasmatique en IGF-1 a été évaluée *via* un dosage ELISA (RayBio® Human IGF-1 ELISA kit, RayBiotech, Etats-Unis).

5. Biochimie des lipides - Profils en acides gras

Ces analyses ont été réalisées dans le but d'évaluer la composition en acides gras des lipides circulants des plasmas maternels Fo et F1 et fœtaux F1 et F2 et des lipides membranaires et intracellulaires des placentas des deux générations F1 et F2. Toutes ces analyses ont été réalisées par Marie-Sylvie LALLEMAND et Delphine RALLIARD-ROUSSEAU. J'ai réalisé les analyses statistiques de ces données avec les modèles linéaires (voir §3.) ainsi que des analyses en composantes principales (ACP) en collaboration avec Delphine RALLIARD-ROUSSEAU.

Des échantillons de 100µL de plasma par individu et de 300 mg pour les placentas ont été utilisés. Après une extraction classique des lipides des plasmas en phase chloroforme-méthanol (2/1, v/v) (Folch et al. 1957; Rousseau et al. 2003), les acides gras ont été transméthylés selon la technique de Morisson-Smith, catalysée grâce à un mélange de Boron TriFluoride-Méthanol à 7%. Ce catalyseur va permettre de créer une liaison covalente entre l'acide gras (fonction carboxylique) et un groupement méthyl issu du méthanol. La liaison d'estérification de l'acide gras au glycérol est rompue à chaud à 100°C pendant 1h. Les esters méthyliques des acides gras ont ensuite été analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG, GC 3900 Varian, France) dans une colonne Econo-Cap EC-WAX (Tarrade et al. 2013). Après homogénéisation mécanique avec un ultraturax des placentas, les lipides placentaires ont été extraits de la même façon. Ensuite, les lipides membranaires ou phospholipides (PL, membranes cellulaires) ont été séparés des lipides neutres (LN, stockage de lipides intracellulaires) grâce à des cartouches d'acide de silice (Supelco, Bellefonte, PA), chaque fraction lipidique a alors été transméthylée. Les esters méthyliques obtenus ont été repris dans un petit volume d'hexane avant d'être injectés en CPG pour y être analysés.

La CPG est une méthode de séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Ici elle sera réalisée par

- 101 -

le chromatographe CPG Varian 3900 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'un passeur automatique Varian CP-8410 Auto injector, piloté par informatique grâce au logiciel d'acquisition et d'analyse Galaxie version 1.9 SP1a Varian. Un système de CPG comprend schématiquement 3 modules spécifiques : un injecteur, une colonne contenue dans une enceinte thermo-régulée (four) dont la température peut-être régulée au 1/10ème de °C près et un détecteur relié à un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme.

Les composés gazeux qui sortent de la colonne pénètrent dans la flamme du détecteur. Leur combustion entraîne la formation d'ions et de particules chargées qui sont alors collectés par deux électrodes. Le courant très faible qui en résulte est amplifié et transformé pour pouvoir être mesuré par un électromètre. Un pic apparaît donc sur l'enregistreur, l'air de ce pic reflète la quantité de composé élué, et chaque pic correspond ici à un acide gras du profil. La détection de chacun de ses acides gras en fonction du temps forme un chromatogramme. Les pics sont identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de mélanges connus dit standards FAME de chromatographie (Sigma) permettant la semi-automatisation de l'analyse de nos échantillons. Le profil en acide gras a été établi pour chaque échantillon et exprimé en pourcentage d'acides gras totaux. L'ajout d'un standard interne, l'acide heptadécanoïque (C17:0), introduit avant l'extraction lipidique des plasmas ou avant la transméthylation des acides gras des fractions PL et LN des placentas, a été utilisé pour établir la concentration totale en acides gras ou la quantification relative en acides gras de chaque fraction lipidique placentaire après l'analyse du chromatogramme.

L'analyse a permis d'identifier les acides gras suivants : C14:0 ,C15:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C14:1, C15:1, C16:1n-9, C16:1n-7, C18:1n-9, C18:1n-7, C20:1n-9, C20:1n-7, C22:1n-9, C24:1n-9, C18:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-3, C20:2n-6, C20:3n-3, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:2n-6, C22:4n-6, C22:5n-6, C22:5n-3, C22:6n-3 (**Tableau Annexe 3**).

6. Modèle statistique

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R (<u>https://www.r-project.org/</u>).

Les analyses statistiques des données générées dans ce projet ont pris beaucoup de temps au cours de cette thèse. La complexité a été de trouver le meilleur modèle

statistique au vu du type d'analyse souhaitée et du nombre d'échantillons. Tout d'abord, il a fallu déterminer quels étaient les facteurs à prendre en compte. Avec un test statistique, nous cherchons à expliquer la variabilité au sein d'une **variable à expliquer** (par exemple le poids des fœtus), tout en sachant que nous avons à notre disposition plusieurs **variables explicatives** (par exemple le nombre de fœtus par portée) qui peuvent expliquer en partie cette variabilité. Dans cette étude, les variables explicatives à disposition pour les analyses fœto-placentaires ont été, en fonction des variables à expliquer, la mère, le sexe de l'individu, la position dans la corne utérine, le nombre de fœtus par portée. La variable explicative « Mère » correspond à la variabilité interindividuelle des lapines gravides. Le sexe des fœtus, leur nombre par portée et leur position dans la corne utérine, ont été pris en compte dans le modèle statistique car ils sont connus pour avoir une influence sur la biométrie fœto-placentaire (Coan *et al.* 2008; Tarrade *et al.* 2013). Pour les analyses des individus F1 adultes, les variables explicatives ont été la mère, le nombre d'individus à la naissance et au sevrage, le lot de naissance, le traitement antibiotique reçu au moment du sevrage.

Dans un premier temps, j'ai réalisé des ANOVA multifactorielles. Cependant, en analysant les résultats de ce test statistique je me suis rendue compte que certaines mères n'étaient pas prises en compte dans les calculs sans pouvoir déterminer l'origine de ce problème de calcul. Après discussion avec un membre du comité de thèse, j'ai réalisé des ANOVA emboîtées où les variables explicatives sont hiérarchisées les unes par rapport aux autres. Pour qu'un facteur A soit emboité dans un facteur B, il faut que chaque modalité du facteur A soit associée à une modalité du facteur B. Dans mon modèle, j'ai emboité la position du fœtus dans le nombre de fœtus par portée dans le facteur mère. Ces modifications dans le script semblaient régler le problème de non prise en compte de certaines mères avec des ANOVA classiques sans pouvoir tenir compte du sexe des fœtus, qui dans les premières analyses ne semblaient pas avoir d'effet. Après discussion au cours d'une réunion du comité de thèse, il a été décidé que je devais rencontrer des statisticiens afin de m'aider à construire le modèle le plus adapté à mes jeux de données. Suite à différents entretiens, le modèle qui semblait le plus approprié pour analyser mes données était le modèle linéaire à effets mixtes.

Dans un deuxième temps, je suis allée à Grenoble dans l'équipe de Rémy SLAMA où Lydiane AGIER m'a aidée à construire un modèle linéaire à effets mixtes. Le terme

- 103 -

d'effets mixtes signifie qu'il y a une combinaison de variables explicatives à effets fixes et d'autres à effets aléatoires. L'intérêt de choisir un modèle linéaire à effets mixtes, contrairement à un modèle linéaire simple, c'est qu'il permet d'intégrer la variabilité liée aux mères (variabilité interindividuelle) en tant qu'unique variable (ici, aléatoire), le reste des variables explicatives étant pris en compte comme dans le modèle linéaire classique (avec des effets fixes). Une sélection backward, c'est-à-dire à posteriori, de ces variables explicatives a été réalisée. Le script de ce modèle est en **Annexe 4**.

Ce modèle statistique a été appliqué à la totalité des données de ma thèse ainsi que sur un ensemble de jeux de données qui concernent d'autres parties du projet comme les échographies, les données de suivi physiologique des individus F1 adultes et tous les jeux de données des profils en acides gras. Ces traitements statistiques m'ont permis de m'impliquer dans l'analyse, la compréhension et l'interprétation des résultats qui concernaient d'autres parties du projet.

Partie C

Résultats de l'étude

Partie C : Résultats de l'étude

Dans cette partie, sont présentés les résultats obtenus au cours de la thèse, sous forme d'articles publiés, en préparation ou des résultats complémentaires non insérés dans une publication à l'heure actuelle.

- Article 1: Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits, publié dans Particle and Fibre Toxicology (Part Fibre Toxicol. 2016 Jul 26;13(1):39. doi: 10.1186/s12989-016-0151-7.).
- 2. Résultats complémentaires sur la première génération
- Article 2: In utero exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function, fatty acids profile and fetal metabolism of the second generation, en preparation (soumission prevue dans Plos One).

1. Article : Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits

Sarah A. Valentino, Anne Tarrade, Josiane Aioun, Eve Mourier, Christophe Richard, Michèle Dahirel, Delphine Rousseau-Ralliard, Natalie Fournier, Marie-Christine Aubrière, Marie-Sylvie Lallemand, Sylvaine Camous, Marine Guinot, Madia Charlier, Etienne Aujean, Hala Al Adhami, Paul H. Fokkens, Lydiane Agier, John A. Boere, Flemming R. Cassee, Rémy Slama and Pascale Chavatte-Palmer

Part Fibre Toxicol. 2016 Jul 26;13(1):39. doi: 10.1186/s12989-016-0151-7.

Cette publication présente les effets d'une exposition maternelle de fumées de moteur diesel pendant la gestation sur la croissance fœtale du $7^{\text{ème}}$ au $28^{\text{ème}}$ jours post-conceptionnels (jpc) sur la structure et la fonction placentaire *via* des approches *in vivo* et *post-mortem* à 28 jpc chez la première génération et explore les effets intergénérationnel jusqu'à la deuxième génération. Les résultats présentés sont essentiellement descriptifs avec des données sur la biométrie fœto-placentaire et le métabolisme fœtal.

RESEARCH

Particle and Fibre Toxicology





Sarah A. Valentino^{1,2}, Anne Tarrade^{1,2}, Josiane Aioun^{1,2}, Eve Mourier^{1,2}, Christophe Richard^{1,2}, Michèle Dahirel^{1,2}, Delphine Rousseau-Ralliard^{1,2}, Natalie Fournier^{3,4}, Marie-Christine Aubrière^{1,2}, Marie-Sylvie Lallemand^{1,2}, Sylvaine Camous^{1,2}, Marine Guinot^{1,2}, Madia Charlier⁵, Etienne Aujean⁵, Hala Al Adhami^{1,2}, Paul H. Fokkens⁶, Lydiane Agier⁷, John A. Boere⁶, Flemming R. Cassee^{6,8}, Rémy Slama⁷ and Pascale Chavatte-Palmer^{1,2*}

Abstract

Background: Airborne pollution is a rising concern in urban areas. Epidemiological studies in humans and animal experiments using rodent models indicate that gestational exposure to airborne pollution, in particular diesel engine exhaust (DE), reduces birth weight, but effects depend on exposure duration, gestational window and nanoparticle (NP) concentration. Our aim was to evaluate the effects of gestational exposure to diluted DE on feto-placental development in a rabbit model.

Pregnant females were exposed to diluted (1 mg/m³), filtered DE (NP diameter \approx 69 nm) or clean air (controls) for 2 h/day, 5 days/week by nose-only exposure (total exposure: 20 days in a 31-day gestation).

Results: DE exposure induced early signs of growth retardation at mid gestation with decreased head length (p = 0.04) and umbilical pulse (p = 0.018). Near term, fetal head length (p = 0.029) and plasma insulin and IGF1 concentrations (p = 0.05 and p = 0.019) were reduced. Placental function was also affected, with reduced placental efficiency (fetal/placental weight) (p = 0.049), decreased placental blood flow (p = 0.009) and fetal vessel volume (p = 0.002). Non-aggregated and "fingerprint" NP were observed at various locations, in maternal blood space, in trophoblastic cells and in the fetal blood, demonstrating transplacental transfer. Adult female offspring were bred with control males. Although fetoplacental biometry was not affected near term, second generation fetal metabolism was modified by grand-dam exposure with decreased plasma cholesterol (p = 0.008) and increased triglyceride concentrations (p = 0.015).

Conclusions: Repeated daily gestational exposure to DE at levels close to urban pollution can affect feto-placental development in the first and second generation.

Background

Diesel engine exhaust (DE) is composed of gases, including volatile and semi-volatile constituents, as well as particulate matter (PM), making up an important part of air pollution in European urban areas [1]. The impact of PM on mortality, cardiovascular and respiratory health in adulthood and also childhood is increasingly well characterized; more uncertainty

* Correspondence: pascale.chavatte@jouy.inra.fr

Full list of author information is available at the end of the article



exists regarding the effects of intra-uterine exposures [2, 3]. During pregnancy, maternal exposure to atmospheric pollution in humans may increase the risk of low birth weight concomitantly with an increase in particle concentration [4–6], with the smaller particular fraction corresponding to an aerodynamic diameter <2.5 μ m (particulate matter 2.5 or PM_{2.5} being probably more harmful than the larger fraction (>2.5 μ m)) [4]. Both increased and decreased placental weight and/or placental efficiency have been associated with PM exposure, depending on the geographical area [7,

© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

¹UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350 Jouy en Josas, France ²PremUp Foundation, Paris, France

8]. Studies in human populations, however, are limited in terms of the ability to explore toxicological mechanisms underlying the effects of DE on the developing fetus, and to explore the specific role of volatile fractions and associated PM.

To investigate this aspect, inhalation studies in animal models (mostly rodents) have been performed using various exposure times, various gestational windows and with varying concentrations of ultrafine particles, i.e. particles in the nanometer size range (NP), which are abundant in DE [9]. Observed biological effects of NP depend on their size, their composition and on the nature of the outer layer of proteins (corona) that forms during transport throughout the body [10]. The corona is considered important for both biocompatibility and transport in biological compartments [11] whereas the chemistry of NP also affects their biodistribution and biodegradation [12]. There is clear evidence from mice [13] and human ex vivo placental studies [14] that injected NP can cross the placental barrier and reach the fetus. In contrast, inhaled 11-15 nm cadmium oxide NP did not reach the fetus in a study in mice [15], suggesting that the inhalation route may not lead to the transfer of NP to the fetus.

Our aim was to observe the impact of maternal exposure to DE during gestation on fetoplacental development and transplacental transfer of NP. Our first hypothesis was that maternal DE exposure could have a negative impact on fetoplacental growth during gestation, and affect the fetal phenotype near term via effects on placental structure and vascularization. We also hypothesized that NP could cross the placenta to reach the fetal circulation. Rabbits were used as models because of their hemodichorial placentation, closer to the human placenta than that of rodents [16], their size which enables ultrasound monitoring during gestation and their short intergenerational period [17]. Nose-only exposure was used as it is more relevant to human exposure than the most often used whole body exposure, which does not discriminate effects due to inhalation from those due to ingestion after self-grooming.

Methods

Ethics

The local ethical committee (N°45 in the French National register) approved the experimentation under N°12/102.

Animal exposure

Twenty-eight pregnant New-Zealand white female rabbits (INRA1077 line, 1-year old) (F0) were exposed by nose-only inhalation in custom made plexiglas tubes to either diluted DE (1 mg/m³) (exposed group) or clean air (control group) for 2 h/day, 5 days/week, from the 3rd to the 27th day post-conception (dpc) (i.e., 20 days altogether over a 31-day gestation) (Fig. 1). DE exposure was performed with the Mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory [18] connected to a 25KVA Loxam engine, with a 500 nm particle filter (Additional file 1: Figure S1).

DE is a complex mixture of hundreds of constituents in either a gas or particle form. Gaseous components of DE include carbon dioxide, oxygen, nitrogen, water vapour, carbon monoxide, nitrogen compounds, sulphur compounds, and numerous low-molecular-weight hydrocarbons (some of them individually known to be



toxic, such as aldehydes, benzene, 1,3-butadiene, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro-PAHS). The particles present in DE are known to be composed of center core of elemental carbon with absorbed organic compounds and small amounts of sulphate, nitrate, metals, and other trace elements [19]. The measured components of the exposure mixture in the present experiment are shown in Additional file 2: Table S1.

Ultrasound/Doppler monitoring

Twelve control and 16 exposed females were examined at 7, 14, 21 and 28 dpc using a Voluson E8 (GE Medical Systems) with a 6-18 MHtz linear probe (RSP6-16). B mode and 2/3D Doppler were performed transabdominally in 5 fetoplacental units/dam in non-sedated dams at 7, 14 and 21 dpc. On 28 dpc, 12 F0 dams were anaesthetized and a laparotomy was performed to analyze placental perfusion by quantitative tridimensional Power Doppler angiography (3D-PDA) [20], directly in contact with the pregnant horn [20, 21]. This procedure, enabling the precise measurement of whole placental perfusion, could only be performed just prior to sacrifice due to the need of a surgical procedure to access the pregnant horns. Perfusion was assessed through three indices: i) the Vascularization Index (VI), which represents the percentage of colored voxels representing the density of fetal vessels in the volume of interest; ii) the Flow Index (FI), that represents voxel intensity (from 1 to 100) depending on the intensity of blood flow and iii) the Vascularization Flow Index (VFI) that is a combination of VI and FI representing the blood perfusion. The relationship between these indices and real blood flow in the placenta was validated in sheep in our laboratory [21]. The high sensitivity of these indices was demonstrated in the pregnant rabbit using a pharmacological agent inducing placental vasoconstriction [20].

After euthanasia, maternal lungs, F1 (first generation) feto-placental units (41 control fetuses and 68 exposed fetuses), maternal and fetal plasma were collected. Functional zones of the placenta, i.e., the labyrinth (exchange area), the junctional zone and the decidua (maternal side) were dissected out. Fetuses and placentas were weighed; fetal length (crown to rump), fetal head (biparietal diameter and head length) and abdominal diameters were measured prior to dissection. Head measurements were performed using a digital caliper. Fetuses were sexed by visual observation of the internal genital organs.

Sixteen other females (N = 7 Controls, N = 9 Exposed) gave birth to F1 offspring, which were raised in control conditions. At 6.5 months of age, F1 females (N = 3 Controls, N = 9 in utero Exposed) were mated to control

males and euthanized at 28 dpc to collect F2 (second generation) feto-placental units as described above.

Immunohistochemistry

Pieces of labyrinthine area were fixed with formalin. Samples were dehydrated in ethanol solutions, cleared in xylene, embedded in paraffin and then cut into 7 μ m thick sections (Leica microtome, Germany). Immunodetection of vimentin was performed to label fetal capillaries on placental sections from the two groups (N = 10 Control and N = 10 Exposed placentas) as described previously [22].

Stereological analysis

After immunodetection, all placental sections were scanned using a NanoZoomer Digital Pathology System (NDP Scan U100074-01, Hamamatsu, Japan). Volume fraction and surface density of the components of the labyrinthine area, i.e. trophoblast, fetal vessels and maternal blood space were quantified using the One Stop Stereology method available on the Mercator[®] software, as described previously [23].

TEM analyses

Labyrinthine area and lung samples collected randomly from 4 fetuses in each litter were fixed with 2 % of glutaraldehyde overnight at 4 °C and then washed 3 times with sodium cacodylate-buffer. Samples were post-fixed in 0.5 % osmium tetroxide, dehydrated using a series of ethanol dilutions and embedded in Epon resin. Sections (0.5 μ m) were stained with Toluidine Blue and examined with an Olympus microscope. Ultrathin sections (75 nm) were stained with lead citrate and examined with a Zeiss EM902 EELS transmission electron microscope.

Biochemistry

Classical biochemistry (triglycerides, cholesterol, glycemia, urea, creatinin, ASAT, ALAT, insulin) was performed on plasma using Beckman Coulter equipment. IGF1 was analyzed by ELISA [24].

Statistical analysis

Data are expressed as: median [Q1; Q3], with first (Q1) and third quartile (Q3) corresponding to 25 and 75 % of scores, respectively. For all data but ultrasound analyses at 7, 14 and 21 days, a linear model was used, with random effect of dam adjusted for treatment, litter size, fetal position in the horn (indexed in 3 categories) and fetal sex using the linear mixed effects model (nlme package, R, Pinheiro, Bates, DebRoy, Sarkar and the R Development Core Team 2013. nlme. R package version 3.1-111; www.r-project.org/). For ultrasound analyses at 7, 14 and 21 days, the linear model was adjusted only for

the dam as the other parameters (sex, position in the horn) were not available.

Results

Intra-uterine growth of the F1 generation with Ultrasound/Doppler monitoring

No sex-specific difference was observed in any of the analyses.

At 7 dpc, no effect of exposure to DE was observed on embryo diameter, perimeter and volume (Additional file 3: Table S2).

At mid-gestation (14 dpc), head length (-9.6 %, p = 0.04) and umbilical pulse (-3.6 %, p = 0.018) were significantly reduced in exposed fetuses vs. controls (Table 1). Other fetal developmental parameters (crown-rump length, body and head width, body perimeter) were not affected.

At 21 dpc, DE exposure was not associated any more with any variation in abdominal perimeter, femur and head length, biparietal diameter, heart rate, nor Doppler (umbilical resistance index and systolic and diastolic velocities) or placental measurements (Additional file 4: Table S3 and Additional file 5: Table S4).

At 28 dpc, i.e., 3 days before birth, umbilical cord and fetal cerebral artery Doppler parameters were not affected by maternal exposure (Additional file 6: Table S5). Head length, however, was significantly decreased (-4 %, p = 0.029) and abdominal perimeter tended to be decreased (-4 %, p = 0.076) in exposed fetuses compared to controls. Placental efficiency, which is defined as the fetal to placental weight ratio, i.e., the number of grams of fetus per gram of placenta, was significantly decreased (-12.3 %, p = 0.049) in the exposed group compared to controls. Other biometric parameters (fetal weight, crown-rump length, biparietal diameter) as well as organ (brain, lung, heart, liver and kidney) to fetal weight ratios and placental parameters (total placental weight, weight of the labyrinthine area and of the decidua) did not vary significantly with DE exposure (Table 2).

Page	4	of	1	4
	-			

Fetal plasma insulin (-44.4 %, p = 0.05) and IGF-1 (-91 %, p = 0.019) concentrations were significantly reduced in exposed compared to control fetuses at 28 dpc (Table 3).

Contemporary to the groups used for fetoplacental exploration, two groups of exposed (N = 7) and control (N = 9) dams (F0) were allowed to give birth. At birth, litter weight tended to be lower in exposed vs. control dams (-18.3 %, p = 0.065) (Additional file 7: Table S6).

Materno-placental exchanges and placental vascularization Quantitative Power Doppler analysis of placental vascularization at 28 dpc

Near term, DE exposure induced reductions in VI (-66.1 %, p = 0.017), FI (-9.3 %, p = 0.009) and VFI (-70.1 %, p = 0.015) (Fig. 2b, c, d). Altogether these data show that maternal exposure to diluted filtered DE induced a reduction in placental blood flow near the term.

Placental stereology

The rabbit placenta develops as a labyrinthine and hemodichorial placenta close to that of the human (villous and hemochorial) [16] and is made up of three compartments: the decidua (of maternal origin), and the junctional and labyrinthine areas of fetal origin (Fig. 2a). Materno-fetal exchanges take place in the labyrinthine area, which cellular composition was explored by stereology (Fig. 3a and b). At 28 dpc, the relative volume fractions of trophoblastic cells (-43 %, p = 0.004) and fetal capillaries (-42 %, p = 0.002) were significantly decreased in exposed placentas compared to controls (Fig. 3c and d). The relative surface density of fetal capillaries was significantly reduced in the labyrinthine area (-31.7 %, p = 0.014) from exposed compared to control fetuses (Fig. 3f). In contrast, the relative volume of maternal blood space was significantly larger (+116 %, p = 0.0001) in the exposed group compared to controls (Fig. 3e). The relative volume (+370 %, p = 0.001) and surface of circulating immune cells (+469 %, p =0.001) in the maternal space were significantly

Variable	Number of fetuses		Median [Q1; Q3]	Median [Q1; Q3]		Adjusted p-value		
	С	E	С	E	β value	CI	P-value	
Crown-rump length (mm)	35	65	11.3 [10.8; 11.8]	11.2 [10.8; 11.8]	-0.275	[-0.821;0.271]	0.332	
Body width (mm)	35	64	5.0 [4.7; 5.2]	5.0 [4.7; 5.2]	0.009	[-0.245;0.263]	0.945	
Head length (mm)	36	64	8.4 [7.5; 9.15]	8.2 [6.9; 8.6]	-0.59	[-1.116;-0.064]	0.040*	
Head width (mm)	36	64	4.3 [4.0; 4.6]	4.2 [3.9; 4.5]	-0.107	[-0.29;0.076]	0.261	
Body perimeter (mm)	35	65	68 [63.9; 70.3]	67.4 [64.9; 69.8]	0.902	[-2.457;4.26]	0.602	
Umbilical pulse (beat/min)	33	65	222 [219.5; 227.5]	214.5 [208.8; 218.6]	-8.807	[-15.527;-2.088]	0.018*	

The effects of gestational DE exposure on fetal body and head parameter (length, width and perimeter) and on umbilical pulse were measured with Doppler ultrasound in control (C) and exposed (E) groups. The linear model was adjusted only for the dam and all data are expressed as median [Q1; Q3] (*p < 0.05, compared with control group)

Variable	Number of fetuses		Median [Q1; Q3]		Fully adjusted linear model		
	С	Е	С	E	β value	CI	<i>P</i> -value
Fetal weight (g)	41	68	38.5 [36.0; 41.7]	34.45 [31.1; 37.8]	-1.895	[-5.362;1.571]	0.307
Crown-rump length (cm)	41	68	12.0 [11.6; 12.5]	11.7 [11.1; 12.1]	-0.107	[-0.494;0.28]	0.596
Biparietal diameter (mm)	41	66	17.9 [17.5; 18.2]	17.2 [16.3; 17.8]	-0.697	[-1.649;0.256]	0.178
Head length (mm)	41	66	29.5 [28.7; 30.2]	28.4 [27.4; 29]	-1.293	[-2.301;-0.2285]	0.029*
Abdominal perimeter (cm)	41	67	7.5 [7.3; 8.0]	7.2 [6.8; 7.5]	-0.529	[—1.058;0]	0.076
Brain weight (g)	40	68	0.92 [0.88; 0.96]	0.93 [0.86; 0.96]	0.011	[—0.055;0.077]	0.746
Brain/Fetus weight ratio	40	68	0.025 [0.023; 0.028]	0.027 [0.025; 0.030]	0.002	[-0.001;0.004]	0.241
Lung/Fetus weight ratio	39	66	0.029 [0.027; 0.031]	0.030 [0.028; 0.032]	0	[-0.001;0.002]	0.570
Heart/Fetus weight ratio	41	68	0.006 [0.005; 0.006]	0.005 [0.005; 0.006]	0	[0;0.001]	0.662
Liver/Fetus weight ratio	41	68	0.066 [0.063; 0.072]	0.068 [0.062; 0.071]	-0.002	[-0.007;0.003]	0.514
Kidney/Fetus weight ratio	39	64	0.0006 [0.0006; 0.0007]	0.0006 [0.0005; 0.0007]	0	[0;0]	0.999
Placental weight (g)	41	68	7.32 [6.64; 8.43]	7.51 [6.83; 8.57]	0.153	[-0.794;1.1]	0.756
Labyrinthine area weight (g)	41	66	5.03 [4.41; 5.92]	4.99 [4.34; 6.05]	-0.17	[-1.003;0.663]	0.695
Decidual weight (g)	41	66	2.16 [1.98; 2.56]	2.51 [2.14; 2.96]	0.307	[-0.164;0.778]	0.226
Placental efficiency	41	68	5.29 [4.65; 5.51]	4.64 [3.92; 5.00]	-0.63	[-1.187;-0.074]	0.049*

Table 2 Fetoplacental biometry at 28 dpc for the first generation

Female rabbits inhaled 1 mg/m³ of NP, 2 h/day, 5 days/week, from 3 dpc to 27 dpc. Dams were euthanized and fetoplacental units of control (C) and exposed (E) group were collected at 28 dpc. Effect of pregnancy exposure to engine diesel exhaust on first-generation fetuses was estimated using a linear model with random effect of dam adjusted for litter size and position of the fetus in the horn. All data are expressed as median [Q1; Q3] (*p < 0.05, compared with control group)

increased in exposed placentas compared to controls (Additional file 8: Table S7).

These measurements confirmed the in vivo observations made with 3D-PDA.

Transplacental transfer of NP

To determine the ability of inhaled diesel NP to reach the fetus, ultrathin sections of maternal lungs and placental labyrinthine area collected at 28 dpc were examined by Transmission Electron Microscopy

Table 3 Fetal metabolism at 28 dpc for the first generation

(TEM). Since the identification of NPs in the placental tissues was only based on TEM observations, the observed black particles are described below as "NP-like".

NP-like were observed in lungs of exposed does, located specifically in type 1 pneumocytes within both the cytoplasm and the nucleus (Additional file 9: Figure S2). Isolated, non-aggregated NP-like were also observed within blood vessels (in maternal erythrocytes and plasma) (Additional file 10: Figure S3).

Variable	Number of fetuses		Median [Q1; Q3]		Fully adjusted linear model		
	С	Е	С	E	β value	CI	P-value
Glycemia (mmol/L)	16	20	4.250 [3.200; 4.675]	4.210 [3.150; 5.358]	0.401	[-0.794;1.597]	0.521
Insulin (mUI/L)	17	19	1.800 [1.300; 2.950]	1.000 [0.700; 1.400]	-0.998	[-1.886;-0.111]	0.050*
Total cholesterol (mmol/L)	17	20	1.950 [1.640; 2.620]	2.115 [1.818; 2.455]	0.013	[-0.436;0.462]	0.956
HDL cholesterol (mmol/L)	17	20	0.460 [0.433; 0.498]	0.400 [0.360; 0.490]	0.035	[-0.03;0.099]	0.309
Non-HDL cholesterol (mmol/L)	17	20	1.590 [1.275; 2.165]	1.645 [1.388; 1.948]	-0.022	[-0.412;0.369]	0.915
Triglycerids (mmol/L)	15	20	0.570 [0.460; 0.670]	0.585 [0.445; 0.870]	0.062	[-0.238;0.362]	0.689
ASAT (UI/L)	17	20	168.0 [86.50; 184.5]	171.5 [129.3; 217.5]	26.413	[-19.769;72.594]	0.284
ALAT (UI/L)	10	16	7.000 [6.000; 9.500]	9.000 [7.000; 9.750]	1.18	[-1.068;3.428]	0.326
Creatinine (µmol/L)	17	20	87.00 [84.50; 91.00]	95.00 [92.00; 104.8]	7.329	[-3.003;17.662]	0.190
Urea (mmol/L)	17	20	5.600 [5.150; 5.850]	6.500 [5.425; 7.450]	0.841	[-0.369;2.05]	0.199
IGF-1 (nmol/L)	20	20	1.184 [0.337; 2.368]	0.108 [0.000; 1.581]	-0.105	[-0.179;-0.031]	0.019*

Effect of exposure to engine diesel exhaust on first-generation fetuses was estimated using a linear model with random effect of dam adjusted for litter size and position of the fetus in the horn. All data are expressed as median [Q1; Q3] (*p < 0.05, **p < 0.01, compared with control group) ASAT ASpartate Amino Transferase, ALAT ALanine Amino Transferase



In the placenta, diffuse aggregated NP-like were observed along the microvilli of syncytial membranes by TEM analysis in the maternal blood spaces of exposed placentas (Fig. 4b), while no NP-like could be identified in control placentas (Fig. 4a). Free "finger-print" like NPlike were also found in maternal blood spaces (Fig. 4c and d). In the cytoplasm of trophoblastic cells, isolated NP-like were located in endosomes (Fig. 4f), in figures of autophagy (Fig. 4g) and in lysosomes (Fig. 4h). No similar observation was made in control placentas (Fig. 4e). Compact NP-like were observed scarcely scattered in the nucleus of some trophoblastic cells whose cytoplasm was well-preserved (Fig. 4j). In contrast, numerous small NP-like (diameter 40 ± 10 nm, N = 60) were present in the nuclei of other trophoblastic cells (Fig. 4k and l), together with morphological organelle abnormalities indicating cellular death (Fig. 4k and l). This was not observed in control animals (Fig. 4i). Other "finger-print" like particles were also observed in the trophoblast (data not shown). Aggregated NP-like were visualized in the lumen of fetal vessels from exposed animals (Fig. 4n) but not in controls (Fig. 4m). Finally, NP-like were observed in endocytotic vesicles in fetal erythrocytes (Fig. 4o) with some suggestion of on-going formation of "finger-print" like structures (Fig. 4p). The presence of numerous organelles in the fetal erythrocytes from exposed dams suggests a delay in erythrocyte maturation as erythrocytes should contain only hemoglobin at 28 dpc [25].

Fetoplacental biometry and metabolism of second generation (F2)

At adulthood, F1 female rabbits (6.5 months) were mated to generate a second generation. F2 fetoplacental units were collected at 28 dpc.

F0 exposure had no effect on F2 fetal biometry (fetal weight, crown-rump and head length, biparietal diameter and abdominal perimeter). Organs-to-fetal weight ratios were similar in the two groups for all considered organs (brain, lungs, heart, liver and kidneys). There was no significant effect on placental biometry (placental weight, labyrinthine area weight, decidual weight and placental efficiency) (Additional file 11: Table S8). Conversely, in "exposed" F2 fetuses, plasma triglyceride concentrations were significantly increased (+25.9 %, *p* = 0.015) whereas total fetal plasma cholesterol and non-HDL cholesterol concentrations were significantly decreased (-25.9 %, *p* = 0.008 and -26 %, *p* = 0.007, respectively) compared to controls (Table 4).

Discussion

Exposure to DE

The DE exposure (1 mg/m³, 2 h/day, 5 days/week for 20 days over 31-day gestation, with mean diameter = 69 nm) in the present study equates to a mean exposure of 80 μ g/m³ over 24 h, which is much higher than the 25 μ g/m³ WHO daily average recommendation for PM_{2.5} [26], whereas there are no recommendations for NP. This DE exposure is similar to the daily human



exposure in large European areas when people drive or walk on big roads twice a day. It could be possible that a daily 2 h exposure at 1 μ gram/m³ may have a different impact than a same pulmonary dose delivered over a 24 h period, but most studies consider the accumulation effect. Several studies in rats and mice, however, have been published in which similar or even higher doses and concentrations were used for longer exposure durations without observing moderate to severe detrimental effects in the lung [27, 28].

Fetal growth

In this study, DE exposure induced signs of growth retardation at mid-pregnancy in the first generation, with a reduction in head length and umbilical pulse, suggesting fetal distress, which is in agreement with previous observations in humans [5]. In the present rabbit model, although signs of hypotrophy were observed by ultrasound at 14 dpc, no hypotrophy was observed at 21 dpc, suggesting that catch-up growth occurred in the second half of pregnancy. This is possibly due to placental adaptations aimed at overcoming growth retardation as described in the context of maternal over nutrition in mice, where initial IUGR induced by maternal excess nutrition around mid-pregnancy was subsequently compensated for by an increase in the expression of placental transporters [29]. Here, on 28 dpc, i.e., 3 days before term, however, the decreased placental blood flow due to reduced placental vascularization was associated with a limited hypotrophy, i.e., a reduction in head length with a tendency for a reduced abdominal perimeter, which indicates that these adaptations were not


(See figure on previous page.)

Fig. 4 Localization of nanoparticles in the placenta at 28 dpc. Ultrathin sections were performed on labyrinthine area in placentas from control (**a**, **e**, **i**, **m**) and exposed (**b**-**d**, **f**-**h**, **j**-**l**, **n**-**p**) dams and analyzed by TEM. Arrows indicate nanoparticles and arrowheads "finger-print" like particles. Several observations were made with various magnifications allowing the observations of different cellular compartments. Scale bars: **a**: 2 µm; **b**: 800 nm; **c**: 2 µm; **d**: 100 nm; **e**: 1.6 µm; **f**: 700 nm; **g**: 1.25 µm; **h**: 1 µm; **i**: 1.6 µm; **j**: 1 µm; **k**: 1 µm; **k**: 700 nm; **m**: 2.5 µm; **n**: 1 µm; **o**: 400 nm; **p**: 20 nm. Abbreviations: E: Erythrocyte; EC: Endothelial Cell; FV: Fetal Vessel; G: Golgi apparatus; Ly: Lysosome; m: mitochondria; MBS: Maternal Blood Space; mvb: multivesicular body; N: Nucleus; rer: rough endoplasmic reticulum; T: Trophoblast

sufficient to sustain fetal growth up to term. Overall, these results are in agreement with those of Slama et al. [5], in humans, showing decreased biparietal diameter in relation to maternal individual exposure to benzene (a marker of traffic-related pollutants in non-smoking women) in the second and third trimester of pregnancy, measured by ultrasound. Effects on head circumference at birth have also been observed for $PM_{2.5}$ in other human studies [4].

The reduced fetal head length associated to a weak decrease of the abdominal perimeter at 28 dpc may, as well as the reduced placental efficiency, suggest that placental compensation mechanisms that developed at mid-gestation became insufficient to maintain optimal fetal development near term, as observed in protein-restricted pregnant mice [30].

Fetal insulin is known to act as a growth factor [31]. Hypoinsulinemia correlated with a decrease in IGF-1 concentration, as observed here in F1 fetuses, has been associated with growth retardation in rat fetuses [31]. These observations are also supported by another study in rabbits showing a positive correlation between plasma insulin concentrations and fetal bodyweight, reflecting the involvement of insulin in the regulation of fetal growth [32]. In IUGR humans, hypoinsulinemia was only observed at adulthood [33].

In animal models, controversial effects of DE inhalation on feto-placental development have been reported (See exposure details in Table 5). In rats, mice and rabbits, the United States Environment Protection Agency tested the effects of concentrations of 6 to 12 fold that of limit values for DE exposure in humans during the first half of gestation and found no effects on fetal survival and development [9]. In contrast, other studies have shown that high gestational exposure throughout pregnancy [34] or exposure to moderate concentrations during the first week of gestation [35] can decrease fetal [34, 35] and sometimes also placental weights [35]. Paradoxically, in rats, an increase in fetal weight in females only and a reduction in placental weight in males only were observed after exposure to very high concentrations of DE [36]. Such an increase in fetal weight, together with a decrease in crown-rump length was also reported in rats exposed to low concentrations of DE [37]. These different observations might be explained by differences in animal models (species, strain), gestational window of exposure, timing and duration of daily exposure, particle size (filtered or total DE) or particle concentration. No clear mechanistic explanation, however, can be inferred from these studies.

Placental structure and vascularization

Fetal growth is controlled by placental function, and particularly dependent on placental perfusion. In this study, placental vascularization was decreased with a reduction in relative volume and surface of fetal vessels. This reduction in placental vascularization and perfusion as well as the presence of NP-like in all placental

Table 4 Fetal metabolism at 28 dpc for the second generation

Variable	Number of fetuses		Median [Q1; Q3]		Fully adjusted linear model		
	С	E	С	E	β value	CI	P-value
Glycemia (mmol/L)	14	12	1.400 [1.175; 1.765]	1.730 [1.618; 2.070]	0.257	[-0.173;0.687]	0.275
Insulin (mUI/L)	14	12	4.170 [1.990; 10.09]	2.545 [1.703; 3.765]	-2.965	[-6.245;0.315]	0.111
Total cholesterol (mmol/L)	15	12	2.550 [2.180; 2.640]	1.890 [1.800; 2.240]	-0.416	[-0.648;-0.183]	0.008**
HDL cholesterol (mmol/L)	15	12	0.730 [0.685; 0.790]	0.650 [0.590; 0.750]	-0.071	[-0.156;0.015]	0.143
Non-HDL cholesterol (mmol/L)	15	12	1.730 [1.480; 1.898]	1.280 [1.150; 1.480]	-0.348	[-0.54;-0.156]	0.007**
Triglycerids (mmol/L)	15	12	0.540 [0.440; 0.598]	0.680 [0.610; 0.730]	0.176	[0.062;0.289]	0.015*
ASAT (UI/L)	15	10	107.5 [97.00; 116.0]	110.0 [95.00; 137.0]	15.66	[-14.542;45.863]	0.335
Creatinine (µmol/L)	15	12	72.00 [66.00; 76.25]	72.00 [67.00; 77.00]	0.082	[-6.745;6.909]	0.982
Urea (mmol/L)	15	12	4.650 [3.950; 5.200]	3.700 [3.500; 4.600]	-0.303	[-1.779;1.174]	0.696

The effects of exposure to engine diesel exhaust during grand-mother pregnancy on second-generation fetuses were estimated using a linear model with random effect of dam adjusted for litter size, fetal sex and the position of the fetus in the horn. All data are expressed as median [Q1;Q3] (*p < 0.05, **p < 0.01, compared with control group)

Table 5	Animal	studies	with	DE	exposure
---------	--------	---------	------	----	----------

Animals	Exposure		References	
	Concentration	Duration		
SD rats	10 % DE 6 mg/m ³ NP	6-15 dpc 8 h/d, 7d/w	(9)	
New Zealand rabbits	10 % DE 6 mg/m ³ NP	6-18 dpc 8 h/d, 7d/w	(9)	
CD-1 mice	DE 12 mg/m ³ NP	over 3 generations	(9)	
SIc: ICR mice	DE 3 mg/m ³ NP	2-13 dpc 12 h/d, 7d/w	(34)	
Swiss mice	DE 42 µg/m ³ NP	all gestation 24 h/d, 7d/w	(35)	
F344 rats	Total DE 5.63 mg/m ³ NP	7-20 dpc 6 h/d, 7d/w	(36)	
Fisher rats	DE 148.86 μg/m ³ NP	1-19 dpc 5 h/d, 7d/w	(37)	
C57 Bl/6 J mice	DE 300 μg/m ³ NP	0.5-17 dpc 6 h/d, 7d/w	(38)	
BalbC mice	DE 27.5 μg/m ³ NP	over 3 generations	(48)	
BalbC mice	DE 27.5 μg/m ³ NP	over 3 generations	(47)	
New Zealand rabbits	DE 1 mg/m ³ NP	3-27 dpc 2 h/d, 5d/w	Present study	

All these studies were cited in Discussion

compartments, and in particular on the microvillous membrane, could contribute to the reduced nutrient exchanges between the maternal and the fetal blood. Moreover, using TEM, we observed trophoblastic cells with nuclei filled with NP-like together with altered organelle structure (data not shown), suggesting cell degeneration. Although they could not be quantified (in terms of number of cells affected), placental function could possibly be affected. In mice, in utero exposure to 300 µg/m³ (6 h/day, 5 days/week) of inhaled DE did not affect fetal weight but decreased placental weight [38]. The authors mentioned an increase in stromal density (not quantified) which could have induced a reduction in the labyrinthine vascular space, in agreement with our observations [38]. In the present study, placental perfusion, as measured by 3D-PDA, was affected by DE maternal exposure and associated with the decreased vascular density observed through the stereological approach [20]. IUGR and decreased placental vascularization were also observed in a mice study with maternal exposure to PAH before conception [39]. In terms of effects of DE on placental function, the placental immune function has been explored [40] but so far, in vivo or histological exploration of placental vascularization as performed in the current study have, to our knowledge, rarely been performed. Moreover, most studies used rodent models, for which the placenta is not as close to that of humans compared to rabbits [16, 17, 41, 42].

Transplacental transfer of NP

The transplacental transfer of NP has been demonstrated using animal models mostly after intravenous or intraperitoneal NP injections [11, 13, 43]. Blum et al. [15], however, showed that inhaled cadmium oxide NP could reach the placenta but not the fetus. In the present study using inhaled NP-rich DE, NP-like were observed in lungs of exposed does in type 1 pneumocytes and within blood vessels (in maternal erythrocytes and plasma), which we assume to be of DE origin. This would demonstrate that NP are able to cross the lung barrier and reach maternal organs, including the placenta. Indeed, in the cytoplasm of placental trophoblastic cells, similar NP-like were observed as isolated structures in endosomes, in figures of autophagy and in lysosomes, indicating that endocytosis may be one way for the transplacental transfer of NP. Moreover, we demonstrated that NP-like are able to reach the fetal erythrocytes, as also shown by Soler et al. [44]. Nevertheless, the mechanism through which NP-like cross the placenta remains unknown and may depend on their chemical composition [43]. We hypothesize that NP-like could cross placenta by endocytosis, but could also be conveyed through by simple diffusion or facilitated transport, also depending on their size. This deserves to be further investigated. Moreover, the different forms for isolated, aggregated NP-like or "finger-print" like particles observed in the placenta could reflect an ongoing transformation process of the inhaled NP, in relation to the repeated exposure throughout gestation. Small NPlike could be the result of recent DE exposure whereas the "finger-print" like particles could result from the degradation of NP inhaled at the beginning of the experiment. These "finger-print" like particles have been previously observed in mouse spleen and liver after injection of magnetic iron NP and have been suggested to result from a lysosomal degradation process [45]. Further analyses will be performed to determine the chemical composition of these NP in order to confirm that they originate from inhaled diesel exhaust and study if iron metabolism is involved in this degradation.

Intergenerational effects

At birth, exposed F1 litter weight tended to be lower compared to controls. They had caught up at adulthood (data not shown). Whether intergenerational effects could be conveyed through contamination of the maternal milk remains to be determined. Nevertheless, so far, preliminary studies on the maternal mammary gland do not provide clear evidence of the presence of NP in mammary tissue (data not shown).

In this study, intergenerational effects were observed on the second generation. The plasma concentrations of triglycerides were higher and that of cholesterol were lower in "exposed" F2 fetuses compared to controls, indicating metabolic dysfunction. This metabolic impairment during in utero life could predispose offspring to the onset of metabolic syndrome at adulthood, as shown by Picone et al. [46] and Tarrade et al. [47] in a context of maternal high fat diet in rabbits. Moreover, in a study in mice, cumulative effects were observed after continuous exposure of males and females to Sao Paulo air pollution for 3 generations: in the third generation, IUGR and a reduction in volume, caliber and surface of maternal placental space together with an increase in placental fetal vessel surface were observed [48, 49]. These experiments, however, did not discriminate between pre-conceptional, gestational and postnatal effects, nor between paternal and maternal effects. In the present study, the intergenerational effects, as observed in F2 fetuses, could be due to metabolic modifications during fetal and post-natal growth of the F1 animals and thus could possibly not be directly caused by NP but result from indirect effects.

Relative role of NP and other DE components

Altogether, the effects observed here could be due to either NP or Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) among other volatile components and most probably to the combined effects of several components of the mixture composing DE. Indeed, one study in humans compared the vascular effects of the inhalation of total DE, filtered DE or pure carbon nanoparticulate in healthy adult patients [50]. Only total DE significantly affected plasma concentrations of vasodilators, whereas filtered DE and pure carbon nanoparticulate did not have a significant effect [50]. The effect of the combined elements could be due to the adsorption of the volatile compounds on the corona of the NP.

Strengths and limitations

Rabbits were used because of their hemodichorial placenta closer to humans than those of rodents, with a body size enabling ultrasound monitoring during gestation like in humans. Moreover, genetic diversity is maintained in rabbits as opposed to the inbred genetic lines available in rodents. This experiment focused on fetoplacental development of the first and the second generations after exposure of F0 females but did not aim at studying intergenerational effects (involving the F3). The technical option of nose-only exposure was selected in order to avoid oral absorption of NP through selfgrooming. The use of filters blocking particles with a diameter larger than 500 nm mimicked the diesel particulate filters installed in current diesel vehicles.

Nevertheless, the results obtained here should be confirmed in other studies in humans and/or animals. Rabbits, like rodents, are polycotous animals, in contrast to the unique or twin pregnancy in humans. Their gestation length is short (31 days), thus reducing the likelihood to observe chronic adaptive mechanisms as could be developed during a 9 month long human pregnancy. Furthermore, dams were exposed twice a day to a peak concentration rather than being exposed to lower concentrations throughout the day. Our experimental model is also not totally applicable to the human situation because exposure occurred only during gestation with no preconceptional or postnatal exposure. The sample size was also obviously limited by technical constraints. Our choice was not to formally rely on significance testing, but to look for coherent patterns in associations with DE exhaust. Finally, we have not so far characterized the chemical composition of NP, even though a carbon core is most probable according to the literature. We are aware that, given the novelty of the field, our study represents a first step to highlight potential risk factors for birth outcomes, and should be seen as hypothesisgenerating. These hypothesis need to be confirmed by future studies.

Conclusion

The data presented in this paper demonstrates that placental function is disturbed by maternal exposure to DE rich in NP, especially through a reduced placental vascularization in rabbits. Fetal growth is affected, in agreement with the limited observational studies in humans [8]. Decreased fetal plasma insulin and IFG1 concentrations are in agreement with data from other animal models [31]. Moreover, NP from DE are able to cross the placenta and reach the fetal circulation, although limited effects were observed in the fetus in the present study. Nevertheless, the toxicity of inhaled DE on offspring health should be further explored up to adulthood. DE exposure affects fetal metabolism in the second generation, thereby demonstrating intergenerational effects.

Altogether, these data indicate that during pollution peaks, pregnant women, and not only infants and elderly people, should be considered as a high risk population. Atmospheric pollution should be taken into account, as well as maternal nutrition, bodyweight, stress, pharmaceutical treatment, as a disruptor on offspring's phenotype establishment at adulthood.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Particle size distribution during exposure. (PPTX 52 kb)

Additional file 2: Table S1. Diesel exhaust composition during exposure. NO: Nitrogen Oxid, CO: Carbon Oxid. (PPTX 46 kb)

Additional file 3: Table S2. Ultrasound embryo measurements at 7 dpc in first generation. Ellipse was used to measure embryo diameters. Diameter 1 represents the longest one and Diameter 2 the shortest one. All data are expressed as median [Q1;Q3]. (PPTX 51 kb)

Additional file 4: Table S3. Ultrasound fetal measurements at 21 dpc in the first generation. All data are expressed as median [Q1;Q3]. (PPTX 63 kb)

Additional file 5: Table S4. Ultrasound placental measurements at 21 dpc. Mean Grey represents the density of tissu of interest. All data are expressed as median [Q1;Q3]. (PPTX 46 kb)

Additional file 6: Table S5. Ultrasound fetal measurements at 28 dpc. All data are expressed as median [Q1;Q3]. (PPTX 64 kb)

Additional file 7: Table S6. Bodyweight at birth in first generation. All data are expressed as median [Q1;Q3]. (PPTX 39 kb)

Additional file 8: Table S7. Morphological analysis of labyrinthine area at 28 dpc from first generation. All data are expressed as median [Q1;Q3]. (PPTX 63 kb)

Additional file 9: Figure S2. Head measurements during gestation and post-mortem. During gestation, head length was measrued by ultrasound. Post-motem, head measurements were performed using a digital caliper. (PPTX 775 kb)

Additional file 10: Figure S3. Distribution of nanoparticles in the maternal lungs at 28 dpc. Ultrathin sections (75 nm) were obtained from various lung areas: rostral or caudal parenchyma (**a**, **c**, **f**, **g**); rostral or caudal bronchus (**b**, **d**, **e**, **h**). Arrowhaeds indicate particles in alveoli, small arrowheads indicate NP and arrows thin or not indicate isolated particles. Scale bars: (**a**): 20 μ m, insert: 10 μ m; (**b**): 2 μ m; (**c**): 600 nm; (**d**): 1 μ m; (**e**): 500 nm; (**f**): 160 nm; (**g**): 700 nm; (**h**): 500 nm, insert: 400 nm. Abbreviations: Br: brochiolus; E: erythrocyte; EC: endothelial cell; Ly: lysosome; M: macrophage; MC: Smooth muscle cell; N: nucleus; NP: nanoparticles; PnI: type I pneumocyte. (PPTX 1172 kb)

Additional file 11: Table S8. Fetoplacental biometry at 28 dpc for the second generation. Female rabbits inhaled 1mg/m3 of NPs, 2 hours/day, 5 days/week, from 3 dpc to 27dpc. Dams were allowed to give birth generation F1. Adult F1 female (7.5 months of age) were mated and euthanized pregnant at 28 dpc. Fetoplacental units of generation F2 were collected in control (C) and exposed (E) groups. Effect of grand-dam (F0) pregnancy exposure to engine diesel exhaust on second-generation fetuses was estimated using linear model with random effect of dam (F1) adjusted for number of fetuses by dam, fetus position in the horn and fetus sex. All data are expressed as median [Q1,Q3]. (*p < 0.05). (PPTX 76 kb)

Abbreviations

3D-PDA,Tridimensional Power Doppler Angiography; DE, diesel engine exhaust; dpc, days post-conception; F1, first generation; F2, second generation; FI, Flow Index; IGF1, Insulin-like Growth Factor 1; IUGR, Intra-Uterine Growth Restriction, NP, nanoparticles; PAHs, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PM, Particulate Matter; TEM, Transmission Electron Microscopy; VI, Vascularization Index; VFI, Vascularization Flow Index; WHO, World Health Organization.

Acknowledgements

We thank the UCEA (Unité Commune d'Expérimentation Animale) for housing the rabbits and participating to the experiments. We thank the MIMA2 platform for access to medical imaging equipment. This work has

Funding

This study was supported by ANR grant ANR-13-CESA-0011-EPAPP (P. Chavatte-Palmer) and by ERC consolidator grant N°311765–E-DOHaD (PI, R. Slama).

Availability of data and material

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RS, PCP and FC conceived and designed the experiment. SV, EM, CR, MD, MSL and EA contributed to the work with the animals. PF and JB monitored the exposition. SV, AT, JA, EM, CR, DRR, MCA, SC, MD, MG, MSL and PCP participated to tissue collection. JA and AT performed electronic microscopy. SV and AT performed all other analyses on placenta. RS, LA and SV designed the statistical model. SV, AT and PCP wrote the paper. PCP supervised the project. All authors discussed and granted the results. All authors read and approved the final manuscript.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

See Methods.

Author details

¹UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350 Jouy en Josas, France. ²PremUp Foundation, Paris, France. ³UFR de Pharmacie, Univ Paris-Sud, EA 4041/4529 Lip (Sys), Châtenay-Malabry, France. ⁴Hôpital Européen Georges Pompidou (AP-HP), Laboratoire de Biochimie, UF Cardio-Vasculaire, Paris, France. ⁵INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Jouy en Josas, France. ⁶Centre for Sustainability, Environment and Health, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands. ⁷Inserm and Univ. Grenoble Alpes, U823, IAB Research Center, Team of Environmental Epidemiology Applied to Reproduction and Respiratory Health, Grenoble, France. ⁸Institute of Risk Assessment Sciences, Utrecht University, Utrecht, Netherlands.

Received: 8 February 2016 Accepted: 19 July 2016 Published online: 26 July 2016

References

- Schauer JJ, Kleeman MJ, Cass GR, Simoneit BRT. Measurements of emissions from air pollution sources. 2. C1 through C30 organic compounds from medium duty diesel trucks. Environ Sci Technol. 1999;33:1578–87.
- Pope CA, Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: Lines that connect. J Air Waste Manage Assoc. 2006;56(6):709–42.
- Peters A. Ambient Particulate Matter and the Risk for Cardiovascular Disease Introduction. Prog Cardiovasc Dis. 2011;53(5):327–33.
- Pedersen M, Giorgis-Allemand L, Bernard C, Aguilera I, Andersen AM, Ballester F, Beelen RM, Chatzi L, Cirach M, Danileviciute A, et al. Ambient air pollution and low birthweight: a European cohort study (ESCAPE). Lancet Respir Med. 2013;1(9):695–704.
- Slama R, Thiebaugeorges O, Goua V, Aussel L, Sacco P, Bohet A, Forhan A, Ducot B, Annesi-Maesano I, Heinrich J, et al. Maternal personal exposure to airborne benzene and intrauterine growth. Environ Health Perspect. 2009;117(8):1313–21.
- Dadvand P, Parker J, Bell ML, Bonzini M, Brauer M, Darrow LA, Gehring U, Glinianaia SV, Gouveia N, Ha EH, et al. Maternal exposure to particulate air pollution and term birth weight: a multi-country evaluation of effect and heterogeneity. Environ Health Perspect. 2013;121(3):267–373.

- Rahmalia A, Giorgis-Allemand L, Lepeule J, Philippat C, Galineau J, Hulin A, Charles MA, Slama R, Group EM-CCS. Pregnancy exposure to atmospheric pollutants and placental weight: an approach relying on a dispersion model. Environ Int. 2012;48:47–55.
- van den Hooven EH, Pierik FH, De Kluizenaar Y, Hofman A, Van Ratingen SW, Zandveld PYJ, Russcher H, Lindemans J, Miedema HME, Steegers EAP, et al. Air Pollution Exposure and Markers of Placental Growth and Function: The Generation R Study. Environ Health Perspect. 2012;120(12):1753–9.
- Ema M, Naya M, Horimoto M, Kato H. Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. Reprod Toxicol. 2013;42:1–17.
- Hougaard KS, Campagnolo L, Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Valentino S, Park MV, De Jong WH, Wolterink G, Piersma AH, et al. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. Reprod Toxicol. 2015;50890–6238(15):00106–9.
- Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. Nat Nanotechnol. 2011;6(5):321–8.
- Landsiedel R, Fabian E, Ma-Hock L, Van Ravenzwaay B, Wohlleben W, Wiench K, Oesch F. Toxico-/biokinetics of nanomaterials. Arch Toxicol. 2012;86(7):1021–60.
- Qi W, Bi J, Zhang X, Wang J, Wang J, Liu P, Li Z, Wu W. Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. Sci Rep. 2014;4:4352.
- Sønnegaard Poulsen MMT, Leth Maroun L, Mathiesen L, Ehlert Knudsen L, Rytting E. Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta. Nanotoxicology. 2013;1–28.
- Blum JL, Xiong JQ, Hoffman C, Zelikoff JT. Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth. Toxicol Sci. 2012;126(2):478–86.
- Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. J Toxicol Pathol. 2014;27(1):11–8.
- 17. Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Santos AN, Duranthon V. Rabbit as a reproductive model for human health. Reproduction. 2012;144(1):1–10.
- Freney EJ, Heal MR, Donovan RJ, Mills NL, Donaldson K, Newby DE, Fokkens PH, Cassee FR. A single-particle characterization of a mobile Versatile Aerosol Concentration Enrichment System for exposure studies. Part Fibre Toxicol. 2006;3:8.
- U.S.EPA. Health assessment document for diesel engine exhaust. Washington: Office of Transportation and Air Quality; 2002.
- Lecarpentier E, Morel O, Tarrade A, Dahirel M, Bonneau M, Gayat E, Evain-Brion D, Chavatte-Palmer P, Tsatsaris V. Quantification of utero-placental vascularization in a rabbit model three-dimensional power Doppler angiography. Placenta. 2012;33(10):769–75.
- Morel O, Pachy F, Chavatte-Palmer P, Bonneau M, Gayat E, Laigre P, Evain-Brion D, Tsatsaris V. Correlation between uteroplacental three-dimensional power Doppler indices and true uterine blood flow: evaluation in a pregnant sheep model. Ultrasound Obstet Gynecol. 2010;36(5):635–40.
- Tarrade A, Lecarpentier E, Gil S, Morel O, Zahr N, Dahirel M, Tsatsaris V, Chavatte-Palmer P. Analysis of placental vascularization in a pharmacological rabbit model of IUGR induced by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. Placenta. 2014;35(4):254–9.
- 23. Favaron PO, Mess AM, De Oliveira MF, Gabory A, Miglino MA, Chavatte-Palmer P, Tarrade A. Morphometric analysis of the placenta in the New World mouse Necromys lasiurus (Rodentia, Cricetidae): a comparison of placental development in cricetids and murids. Reprod Biol Endocrinol. 2013;11.
- Thieme R, Schindler M, Ramin N, Fischer S, Muhleck B, Fischer B, Santos AN. Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. Mol Cell Endocrinol. 2012;358(1):96–103.
- Baron MH, Isern J, Fraser ST. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. Blood. 2012;119(21):4828–37.
- OMS. Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air: particles, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre. Mise à jour mondiale 2005. In: Synthèse de l'évaluation des risques. 2005.
- McDonald JD, Doyle-Eisele M, Seagrave J, Gigliotti AP, Chow J, Zielinska B, Mauderly JL, Seilkop SK, Miller RA, Committee HEIHR. Part 1. Assessment of carcinogenicity and biologic responses in rats after lifetime inhalation of new-technology diesel exhaust in the ACES bioassay. Res Rep Health Eff Inst. 2015;184:9–44. discussion 141–171.

- Mauderly JL, Barrett EG, Day KC, Gigliotti AP, McDonald JD, Harrod KS, Lund AK, Reed MD, Seagrave JC, Campen MJ, et al. The National Environmental Respiratory Center (NERC) experiment in multi-pollutant air quality health research: II. Comparison of responses to diesel and gasoline engine exhausts, hardwood smoke and simulated downwind coal emissions. Inhal Toxicol. 2014;26(11):651–67.
- Sferruzzi-Perri AN, Vaughan OR, Haro M, Cooper WN, Musial B, Charalambous M, Pestana D, Ayyar S, Ferguson-Smith AC, Burton GJ, et al. An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory. Faseb J. 2013;27(10):3928–37.
- Coan PM, Vaughan OR, McCarthy J, Mactier C, Burton GJ, Constancia M, Fowden AL. Dietary composition programmes placental phenotype in mice. J Physiol. 2011;589(Pt 14):3659–70.
- 31. Hill DJ, Milner RDG. Insulin as a Growth-Factor. Pediatr Res. 1985;19(9):879–86.
- Fletcher JM, Falconer J, Bassett JM. The Relationship of Body and Placental Weight to Plasma-Levels of Insulin and Other Hormones during Development in Fetal Rabbits. Diabetologia. 1982;23(2):124–30.
- Jensen CB, Storgaard H, Dela F, Holst JJ, Madsbad S, Vaag AA. Early differential defects of insulin secretion and action in 19-year-old caucasian men who had low birth weight. Diabetes. 2002;51(4):1271–80.
- Fujimoto A, Tsukue N, Watanabe M, Sugawara I, Yanagisawa R, Takano H, Yoshida S, Takeda K. Diesel exhaust affects immunological action in the placentas of mice. Environ Toxicol. 2005;20(4):431–40.
- Silva IRRE, Lichtenfels AJFC, Pereira LAA, Saldiva PHN. Effects of ambient levels of air pollution generated by traffic on birth and placental weights in mice. Fertil Steril. 2008;90(5):1921–4.
- Watanabe N, Kurita M. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. Environ Health Perspect. 2001;109(2):111–9.
- Li C, Li X, Suzuki AK, Zhang Y, Fujitani Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. J Reprod Dev. 2013;59(2):145–50.
- Weldy CS, Liu Y, Liggitt HD, Chin MT. In utero exposure to diesel exhaust air pollution promotes adverse intrauterine conditions, resulting in weight gain, altered blood pressure, and increased susceptibility to heart failure in adult mice. PLoS ONE. 2014;9(2), e88582.
- Detmar J, Rennie MY, Whiteley KJ, Qu DW, Taniuchi Y, Shang XY, Casper RF, Adamson SL, Sled JG, Jurisicova A. Fetal growth restriction triggered by polycyclic aromatic hydrocarbons is associated with altered placental vasculature and AhR-dependent changes in cell death. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008;295(2):E519–30.
- Auten RL, Gilmour MI, Krantz QT, Potts EN, Mason SN, Foster WM. Maternal Diesel Inhalation Increases Airway Hyperreactivity in Ozone-Exposed Offspring. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012;46(4):454–60.
- Enders AC, Blankenship TN. Comparative placental structure. Adv Drug Deliv Rev. 1999;38(1):3–15.
- McArdle AM, Denton KM, Maduwegedera D, Moritz K, Flower RL, Roberts CT. Ontogeny of Placental Structural Development and Expression of the Renin-Angiotensin System and 11 beta-HSD2 Genes in the Rabbit. Placenta. 2009;30(7):590–8.
- Rattanapinyopituk K, Shimada A, Morita T, Sakurai M, Asano A, Hasegawa T, Inoue K, Takano H. Demonstration of the Clathrin- and Caveolin-Mediated Endocytosis at the Maternal-Fetal Barrier in Mouse Placenta after Intravenous Administration of Gold Nanoparticles. J Vet Med Sci. 2014;76(3):377–87.
- Soler MAG, Bao SN, Alcantara GB, Tiburcio VHS, Paludo GR, Santana JFB, Guedes MH, Lima ECD, Lacava ZGM, Morais PC. Interaction of erythrocytes with magnetic nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol. 2007;7(3):1069–71.
- Levy M, Luciani N, Alloyeau D, Elgrabli D, Deveaux V, Pechoux C, Chat S, Wang G, Vats N, Gendron F, et al. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. Biomaterials. 2011;32(16):3988–99.
- 46. Picone O, Laigre P, Fortun-Lamothe L, Archilla C, Peynot N, Ponter AA, Berthelot V, Cordier AG, Duranthon V, Chavatte-Palmer P. Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. Theriogenology. 2011;75(2):287–99.
- 47. Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Aubriere MC, Peynot N, Dahirel M, Bertrand-Michel J, Aguirre-Lavin T, Morel O, Beaujean N, Duranthon V, et al. Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a high fat and control maternal diets in a rabbit model. PLoS ONE. 2013;8(12), e83458.
- 48. Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Silva RMG, Scoriza JN, Saldiva PHN, Caldini EG, Dolhnikoff M. Chronic exposure to fine particulate matter

emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. Environ Res. 2009;109(5):536–43.

- Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Ribeiro A, Mayhew TM, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. Biol Reprod. 2008;79(3):578–84.
- Mills NL, Miller MR, Lucking AJ, Beveridge J, Flint L, Boere AJ, Fokkens PH, Boon NA, Sandstrom T, Blomberg A, et al. Combustion-derived nanoparticulate induces the adverse vascular effects of diesel exhaust inhalation. Eur Heart J. 2011;32(21):2660–71.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research
 Submit your manuscript at
 www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central



Figure S1 | Particle size distribution during exposure.





Figure S2 | **Head measurements during gestation and post-mortem** During gestation, head length was measured by ultrasound.

Post-motem, head measurements were performed using a digital caliper.



Figure S3 | Distribution of nanoparticles in the maternal lungs at 28 dpc. Ultrathin sections (75 nm) were obtained from various lung areas : rostral or caudal parenchyma (a, c, f, g); rostral or caudal bronchus (b, d, e, h). Arrowhaeds indicate particles in alveoli, small arrowheads indicate NP and arrows thin or not indicate isolated particles.

Scale bars: (a): 20 μm, insert: 10 μm; (b): 2 μm; (c): 600 nm; (d): 1 μm; (e): 500 nm; (f): 160 nm; (g): 700 nm; (h): 500 nm, insert: 400 nm.

Abbreviations: Br : brochiolus ; E: erythrocyte ; EC : endothelial cell; Ly : lysosome ; M : macrophage ; MC : Smooth muscle cell ; N : nucleus ; NP : nanoparticles ; PnI : type I pneumocyte.

	Particles Mass concentration (µg/m ³)	Particles number concentration (#/cm ³)	Alveolar surface area (nm²/cm³)	Count median diameter (nm)	NO (ppm)	NOx (ppm)	NO2 (ppm)	CO (ppm)
Mean	1014	2585000	6420	69	25.2	25.9	0.7	5.6
Standard Deviation	133	249000	1000	1	3.8	3.6	0.5	0.4

Table S1 | Diesel exhaust composition during exposure.

NO: Nitrogen Oxid, CO: Carbon Oxid.

Table S2 | Ultrasound embryo measurements at 7 dpc in first generation.

Variable	Num emb	ber of oryos	Median	[Q1; Q3]	Dam - adjusted linear model				
	С	Е	С	Е	βvalue	CI	p-value		
Diameter 1 (mm)	39	103	6.4 [5.4; 7.1]	6.1 [5.1; 6.9]	-0.384	[-1.144;0.376]	0.328		
Diameter 2 (mm)	39	103	5.3 [4.6; 6.4]	5.2 [4.2; 6.0]	-0.404	[-1.251;0.443]	0.355		
Perimeter (mm)	39	103	18.5 [16.23; 20.15]	18.2 [14.70; 20.00]	-1.35	[-3.791;1.09]	0.285		
Volume (mm ³)	39	103	102.3 [69.42; 137.2]	98.51 [52.32; 129.7]	-16.652	[-56.916;23.613]	0.422		

Ellipse was used to measure embryo diameters. Diameter 1 represents the longest one and Diameter 2 the shortest one. All data are expressed as median [Q1;Q3].

Table 55 Oni asound retai measurements at 21 upc in the rist generatio.	Table S3	Ultrasound feta	l measurements	at 21 d	pc in th	ne first	generation.
---	----------	-----------------	----------------	---------	----------	----------	-------------

Variable	Number of fetuses		Median	Median [Q1; Q3]		Dam - adjusted linear model			
	С	Е	С	Е	βvalue	CI	p-value		
Abdominal perimeter (mm)	24	48	42.85 [41.85; 43.90]	42.30 [40.70; 43.95]	-0.973	[-2.51;0.564]	0.228		
Femurlength (mm)	19	39	2.8 [2.7; 3.0]	2.8 [2.7; 2.9]	-0.14	[-0.428;0.149]	0.354		
Head length (mm)	24	48	17.50 [16.75; 17.85]	17.10 [16.60; 17.60]	-0.279	[-0.677;0.119]	0.184		
Biparietal diameter (mm)	24	48	9.400 [9.125; 9.825]	9.500 [9.100; 9.875]	-0.123	[-0.582;0.336]	0.603		
Umbilical pulse (beat/min)	24	45	264.0 [257.5; 270.0]	260.0 [256.0; 269.0]	-1.972	[-8.889;4.945]	0.580		
Pulsatility Index	24	45	1.770 [1.613; 1.880]	1.770 [1.635; 1.915]	-0.016	[-0.127;0.095]	0.778		
Resistance Index	24	45	0.840 [0.820; 0.860]	0.830 [0.815; 0.860]	0.001	[-0.019;0.022]	0.906		
Systolic velocity	24	45	15.45 [12.41; 18.55]	14.84 [12.27; 17.29]	-0.523	[-2.442;1.397]	0.597		
Diastolic velocity	24	45	2.550 [2.160; 2.940]	2.310 [2.015; 2.990]	-0.058	[-0.429;0.313]	0.761		
Systolic/Diastolic velocity ratio	24	45	6.300 [5.533; 7.053]	6.050 [5.355; 7.160]	0.149	[-0.61;0.907]	0.703		

All data are expressed as median[Q1;Q3].

Variable	Numl plac	per of entas	Median	[Q1; Q3]	Dam - adjusted linear model				
	С	Е	С	E	βvalue	CI	p-value		
Volume (mm ³)	25	47	7.056 [6.397; 7.618]	7.196 [6.743; 7.698]	-0.031	[-0.642;0.58]	0.921		
Mean Grey	25	47	41.10 [40.17; 42.67]	40.56 [38.04; 41.80]	-0.238	[-2.82;2.345]	0.858		

Table S4 | Ultrasound placental measurements at 21 dpc.

Mean Grey represents the density of tissu of interest. All data are expressed as median[Q1;Q3].

Table S5 | Ultrasound fetal measurements at 28 dpc.

	Variable		nber tuses	Median	Dam - adjusted linear model			
variable		С	E	С	E	βvalue	CI	p- value
	Pulse (beat/min)	17	25	114.0 [96.50; 145.5]	98.00 [70.75; 137.5]	-17.279	[-63.095;28.538]	0.477
	Resistance index	15	18	0.830 [0.773; 0.840]	0.850 [0.748; 0.863]	-0.009	[-0.071;0.053]	0.789
Umbiliant	Pulsatility index	15	19	2.200 [1.570; 2.420]	1.915 [1.773; 2.415]	-0.087	[-0.477;0.303]	0.670
Umbilical	Systolic velocity	16	19	19.42 [16.11; 24.44]	18.82 [10.63; 22.03]	-2.761	[-10.271;4.75]	0.487
	Diastolic velocity	15	18	3.610 [2.700; 4.790]	3.210 [2.650; 3.838]	-0.399	[-1.304;0.506]	0.408
	Syst/Diast velocity ratio	15	18	5.140 [4.250; 6.420]	5.345 [4.083; 6.610]	-0.111	[-1.935;1.713]	0.907
	Pulse (beat/min)	17	26	114.0 [86.50; 161.5]	93.00 [71.75; 116.0]	-26.784	[-75.337;21.769]	0.307
	Resistance index	16	25	0.620 [0.555; 0.668]	0.605 [0.555; 0.640]	-0.003	[-0.067;0.062]	0.935
Canabaral	Pulsatility index	16	25	1.010 [0.895; 1.178]	1.040 [0.930; 1.115]	0.015	[-0.158;0.189]	0.864
Cerebral	Systolic velocity	16	26	6.970 [6.113; 9.698]	8.045 [5.548; 10.73]	1.352	[-1.848;4.553]	0.427
	Diastolic velocity	16	25	2.820 [2.453; 3.063]	3.150 [2.280; 4.155]	0.611	[-0.908;2.13]	0.449
	Syst/Diast velocity ratio	16	25	2.640 [2.275; 2.743]	2.500 [2.295; 2.790]	-0.003	[-0.389;0.383]	0.989

All data are expressed as median[Q1;Q3].

Table S6 | Bodyweight at birth in first generation.

Variable	Number of kits		Median	[Q1; Q3]	Adjusted linear model			
	С	Е	С	Е	βvalue	CI	p-value	
Litter weight at birth	55	83	66.25 [58.00; 69.33]	54.13 [51.00; 68.00]	-8.13	[-16.232;-0.029]	0.065	

All data are expressed as median[Q1;Q3].

Variable	Number of fetuses		Median	[Q1; Q3]	Adjusted linear model			
	С	Е	С	Е	βvalue	CI	p-value	
Volume fraction of trophoblast	10	10	38.78 [27.40; 45.64]	22.01 [15.57; 28.75]	-12.795	[-22.192;-3.398]	0.004**	
Volume fraction of fetal capillaries	10	10	32.56 [28.28; 33.60]	18.78 [15.39; 22.83]	-10.73	[-16.733;-4.727]	0.002**	
Volume fraction of maternal blood space	10	10	24.14 [15.91; 36.59]	52.33 [47.88; 57.45]	26.473	[16.86;36.086]	0.0001***	
Volume fraction of circulating cells	10	10	0.2850 [0.0750; 0.7825]	1.340 [0.858; 1.883]	1.014	[0.49;1.537]	0.001**	
Surface density of trophoblast	10	10	0.1970 [0.1550; 0.2225]	0.1345 [0.1188; 0.1610]	-0.045	[-0.095;0.005]	0.045*	
Surface density of fetal capillaries	10	10	0.1780 [0.1343; 0.1910]	0.1215 [0.1108; 0.1463]	-0.04	[-0.075;-0.005]	0.014*	
Surface density of maternalblood space	10	10	0.1120 [0.0910; 0.1468]	0.1565 [0.1245; 0.1645]	0.033	[0.002;0.065]	0.055	
Surface density of circulating cells	10	10	0.0018 [0.0007; 0.0056]	0.0103 [0.0075; 0.0136]	0.008	[0.004;0.012]	0.001**	

Table S7 | Morphological analysis of labyrinthine area at 28 dpc from first generation.

All data are expressed as median[Q1;Q3].

Table S8 | Fetoplacental biometry at 28 dpc for the second generation.

Variable	Number of fetuses		Median	Fully adjusted linear model			
	С	E	С	Ε	βvalue	CI	p-value
Fetalweight (g)	21	87	42.6 [39.4; 44.5]	38.8 [34.9; 41.8]	-0.485	[-4.036;3.066]	0.793
Crown-rump length (cm)	21	81	12.6 [12.3; 12.8]	12.2 [11.9; 12.4]	-0.236	[-0.521;0.05]	0.136
Biparietal diameter (mm)	21	87	16.6 [16.3; 16.8]	16.2 [15.7; 16.6]	-0.237	[-0.831;0.357]	0.448
Head length (mm)	21	87	28.8 [28.0; 29.3]	27.8 [27.0; 28.5]	-0.143	[-0.772;0.487]	0.665
Abdominal perimeter (cm)	21	87	7.70 [7.50; 8.05]	7.50 [7.10; 7.80]	-0.148	[-0.555;0.259]	0.489
Brain weight (g)	19	79	1.05 [1.00; 1.09]	0.97 [0.92; 1.01]	-0.068	[-0.11;-0.026]	0.01*
Brain/Fetus weight ratio	19	79	0.025[0.024; 0.027]	0.025 [0.024; 0.028]	-0.001	[-0.004;0.001]	0.382
Lung/Fetus weight ratio	21	86	0.030[0.025; 0.032]	0.028 [0.026; 0.031]	-0.001	[-0.004;0.002]	0.551
Heart/Fetus weight ratio	21	85	0.0050 [0.0048 ; 0.0056]	0.0051 [0.0047; 0.0057]	0	[0;0]	0.589
Liver/Fetus weight ratio	21	86	0.071 [0.068; 0.076]	0.072 [0.067; 0.077]	0.001	[-0.004;0.006]	0.835
Kidney/Fetus weight ratio	21	86	$0.0092 \left[0.0088 ; 0.0100 ight]$	0.0087 [0.0082; 0.0093]	-0.001	[-0.001;0]	0.213
Placental weight (g)	21	87	7.5 [6.51; 9.12]	6.76 [5.62; 7.68]	0.047	[-1.467;1.561]	0.952
Labyrinthine area weight (g)	21	87	5.36 [4.31; 6.25]	4.33 [3.84; 5.12]	-0.356	[-1.53;0.819]	0.563
Decidual weight (g)	21	87	2.31 [1.94; 2.86]	2.23 [1.78; 2.77]	0.384	[-0.267;1.035]	0.273
Placental efficiency	21	87	5.38 [4.83; 6.18]	5.64 [5.24; 6.23]	-0.212	[-1.051;0.627]	0.629

Female rabbits inhaled 1mg/m^3 of NPs, 2 hours/day, 5 days/week, from 3 dpc to 27dpc. Dams were allowed to give birth generation F1. Adult F1 female (7.5 months of age) were mated and euthanized pregnant at 28 dpc. Fetoplacental units of generation F2 were collected in control (C) and exposed (E) groups. Effect of grand-dam (F0) pregnancy exposure to engine diesel exhaust on second-generation fetuses was estimated using linear model with random effect of dam (F1) adjusted for number of fetuses by dam, fetus position in the horn and fetus sex. All data are expressed as median[Q1;Q3].(*p < 0.05).

L'exposition à des gaz d'échappement de moteur diesel riches en nanoparticules de lapines Fo pendant leur gestation entraine des signes d'hypotrophie fœtale à migestation avec une réduction de la longueur de la tête et de la pulsatilité ombilicale. A 3 jours du terme, les fœtus exposés présentent une réduction de la longueur de la tête et du périmètre abdominal par rapport au groupe contrôle. De plus, les concentrations plasmatiques fœtales en insuline et IGF-1, marqueurs de retard de croissance *in utero*, sont réduites dans le groupe exposé. Le placenta est sévèrement atteint par cette exposition gestationnelle avec une diminution de l'efficacité placentaire, une large réduction de la vascularisation placentaire et des flux sanguins. Des nanoparticules et des grosses particules de type « finger-print » ont été observées dans tous les compartiments maternels, dans les cellules trophoblastiques (placenta) et jusqu'aux compartiments fœtaux. Enfin, l'exposition des grand-mères Fo entraine une dérégulation du métabolisme fœtal de la 2^{ème} génération qui présente une diminution du cholestérol plasmatique et une augmentation des triglycérides circulants, sans atteinte significative de la biométrie fœto-placentaire.

Une exposition chronique aux gaz d'échappement de moteur diesel pendant la gestation perturbe le développement fœto-placentaire de la première et la deuxième génération.

2. Résultats complémentaires sur la première génération

Les résultats obtenus sur la première génération, c'est-à-dire des altérations de la vascularisation placentaire et des signes d'hypotrophie fœtale à mi-gestation et à quelques jours du terme et publiés dans le premier article nous ont conduit à explorer de façon plus approfondie la fonction placentaire au travers d'approches biochimique et moléculaire.

Dans un premier temps, l'analyse des profils en acides gras dans les plasmas de lapines Fo, dans les placentas et les plasmas fœtaux est développée. La deuxième partie présente l'analyse fonctionnelle placentaire au travers de l'analyse des réseaux de gènes sur- ou sous-exprimés, réalisée à partir de données de transcriptomique obtenues sur les placentas F1.

2.1. Profils en acides gras

Les acides gras sont des composants structuraux des organes, des sources d'énergie et les précurseurs de molécules bioactives tels que les eicosanoïdes, dont les prostacyclines, les prostaglandines, les thromboxanes et les leukotriènes (Cerf & Herrera 2016). Les acides gras régulent aussi l'expression de certains facteurs de transcription. Tous les acides gras fournissent de l'énergie alors que les acides gras polyinsaturés (AGPI) possèdent des fonctions de structure et métabolique. Les familles n-3 et n-6 AGPI sont synthétisés à partir des acides gras essentiels qui sont l'acide α -linolénique (ALA, C18:3n-3) et l'acide linoléique (LA, C18:2n-6), respectivement. ALA et LA ne peuvent être synthétisés de novo (Lorente-Cebrian et al. 2013) et sont par conséquent apportés par l'alimentation (Russo 2009). Au cours de la grossesse, les acides gras essentiels et les AGPI traversent le placenta afin d'approvisionner le fœtus (Sakamoto & Kubota 2004). LA est abondant dans le régime alimentaire occidental et il est le précurseur de l'acide arachidonique (AA, C20:4n-6) (Russo 2009). ALA est abondant dans les huiles de graines et il est le précurseur de l'acide eicosapentanoïque (EPA, C20:5n-3) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6n-3) (Lorente-Cebrian et al. 2013). Au cours du développement, les AGPI les plus importants sont l'AA, EPA et DHA, qui ne sont pas nécessairement apportés par l'alimentation maternelle car ils peuvent être synthétisés de manière endogène à partir des acides gras essentiels. Cependant, la conversion par le fœtus des acides gras

Tableau C.1 | Concentrations totales en acides gras (AG) dans les plasmas F0, les placentas et les plasmas F1 à 28 jpc

Tissu	Nomb fem	ore de elles	Médiane	[Q1; Q3]	Modèle linéaire ajusté			
	Т	Е	Т	Е	β value	IC	p-value	
Plasma maternel F0 (µg/mL)	5	7	455.8 [372.3; 515.3]	461.6 [398.0; 508.5]	-	-	0.489	
Placenta F1 (LN) (mg/g de placenta)	15	15	2.140 [1.870; 2.670]	1.810 [1.420; 2.090]	-0.424	[-0.907;0.058]	0.112	
Placenta F1 (PL) (mg/g de placenta)	14	18	3.295 [3.038; 3.695]	2.900 [2.638; 3.173]	-0.422	[-0.716;-0.128]	0.017*	
Plasma fœtal F1 (µg/mL)	10	10	521.7 [459.4; 599.6]	629.2 [524.4; 729.5]	103.568	[-1.725;208.862]	0.08	

Les données sont exprimées en Médiane[*Q*1;*Q*3]*. E : Exposé; IC : Intervalle de confiance; T: Témoin.*

Tableau C.2 | Profil en acides gras (AG) du plasma des femelles adultes F0 T et E à 28 jours de gestation (% des acides gras totaux)

	Nomb	ore de	Médiane	[01:03]	Modèle	
Variable	femelles		Wiedland			
	Т	E	Т	E	p-value	
C16:0 (PA)	3	9	32,52 [32,14; 34,57]	33,91 [27,04; 35,58]	0,599	
Total C16:1	3	9	7,480 [6,065; 8,340]	7,230 [6,630; 9,030]	0,564	
C18:0 (SA)	3	9	5,590 [5,085; 6,340]	6,310 [5,240; 6,550]	0,399	
Total C18:1	3	9	24,18 [23,02; 24,55]	23,70 [21,56; 27,04]	0,910	
C18:2 n-6 (LA)	3	9	20,54 [19,79; 21,12]	19,55 [18,25; 22,11]	0,442	
C18:3 n-3 (ALA)	3	9	3,170 [2,885; 3,990]	3,250 [2,810; 3,840]	0,850	
C20:1n-7	3	9	0,060 [0,055; 0,060]	0,090 [0,080; 0,100]	0,0018**	
Total C20:1	3	9	0,140 [0,125; 0,155]	0,190 [0,180; 0,200]	0,0022**	
C20:4 n-6 (AA)	3	9	1,010 [0,805; 1,185]	1,060 [0,790; 1,210]	0,913	
C20:5 n-3 (EPA)	3	9	0,090 [0,015; 0,100]	0,010 [0,000; 0,120]	0,541	
C22:4 n-6	3	9	0,050 [0,010; 0,075]	0,120 [0,070; 0,150]	0,0290*	
C22:5 n-6	3	9	0,030 [0,020; 0,085]	0,080 [0,030; 0,100]	0,432	
C22:5 n-3 (DPA)	3	9	0,040 [0,020; 0,095]	0,090 [0,040; 0,110]	0,316	
C22:6 n-3 (DHA)	3	9	0,030 [0,020; 0,060]	0,040 [0,020; 0,060]	0,738	
Total AGS	3	9	41,39 [40,03; 44,40]	43,24 [36,16; 45,34]	0,877	
Total AGMI	3	9	32,20 [29,61; 30,40]	32,02 [30,40; 34,87]	0,601	
Total n-6 AGPI	3	9	22,75 [21,80; 23,22]	21,22 [20,52; 24,92]	0,655	
Total n-3 AGPI	3	9	3,550 [3,280; 4,310]	3,660 [3,420; 4,420]	0,778	
n-6/n-3 AGPI ratio	3	9	6,421 [5,182; 6,930]	5,947 [5,033; 6,155]	0,515	

Les données sont exprimées sous la forme de Médiane[Q1;Q3], en % des acides gras totaux ; AA : C20:4n-6, acide arachidonique ; AGMI : acides gras monoinsaturés; AGPI : acides gras polyinsaturés; AGS : acides gras saturés ; ALA: C18:3n-3, acide alpha-linolénique; DHA : C22:6n-3, acide docosahexaénoïque ; DPA : C22:5n-3, acide docosapentaénoïque ; E : Exposé; EPA : C20:5n-3, acide eicosapentaénoïque ; LA: C18:2n-6, acide linoléique ; PA : C16:0, acide palmitique ; PL : phospholipides ; SA : C18:0, acide stéarique ; T : Témoin.

essentiels en AGPI est très limitée et par conséquent les concentrations plasmatiques et tissulaires en acides gras dépendent fortement de l'apport exogène. Ainsi, pendant les périodes de croissance intra-utérine rapide, les productions d'EPA, DHA et AA peuvent être inadaptées et considérées comme acides gras essentiels par le fœtus. Au cours de la grossesse et la période néonatale, un apport suffisant en acides gras est donc essentiel pour une croissance fœtale optimale et le bon développement et fonctionnement du système neuronal (Innis 1991). La quantité d'acides gras transférée de la mère au fœtus dépend non seulement du métabolisme lipidique maternel mais aussi de la fonction placentaire, c'est-à-dire l'absorption, le métabolisme placentaire et le transfert d'acides gras vers le fœtus (Cetin *et al.* 2009). Chez la femme enceinte, le 3^{ème} trimestre de la grossesse est caractérisé par une augmentation de la proportion d'AGPI à longue chaîne dans la circulation fœtale, notamment pour la croissance cérébrale (Cetin *et al.* 2009).

Les profils en acide gras du plasma maternel Fo, du placenta et du plasma fœtal F1 ont été classiquement analysés par chromatographie en phase gazeuse.

2.1.1. Analyse des profils en acides gras

Les concentrations en acides gras (**Tableau C.1**) ont été quantifiées dans les plasmas maternel et fœtal ainsi qu'au niveau placentaire, en y distinguant deux fractions les lipides neutres et les phospholipides. Tout d'abord, aucune différence n'a été mise en évidence concernant la concentration plasmatique maternelle en acides gras entre les deux groupes de lapines Fo. Au niveau des placentas, l'exposition maternelle n'a pas induit de modification de la concentration en acides gras des lipides neutres, correspondant au stockage de lipides intracellulaires (esters de cholestérol et triglycérides), en revanche une diminution significative de la concentration des acides gras de la fraction phospholipides placentaires a été observée, les phospholipides correspondant aux membranes cellulaires. Aucune différence n'a été observée non plus pour la concentration en acides gras des plasmas fœtaux F1, quel que soit leur exposition *in utero*.

Si nous nous intéressons plus particulièrement à la qualité des acides gras circulants, dans le plasma maternel (Fo), peu de différences significatives ont été mises en évidence (**Tableau C.2**). Seules des augmentations significatives des proportions du C20:1n-7 et du C22:4n-6 ont été observées dans le plasma des lapines Fo exposées. Les

	Nomb	ore de	Médiane	[Q1; Q3]	Mo	odèle linéaire aju	ısté
Variable	placentas				ļ		
	T	E	Т	E	βvalue	IC	p-value
C16:0(PA)	14	18	29,50 [28,50; 30,37]	28,21 [27,42; 28,62]	-1,339	[-2,032;-0,645]	0,003**
TotalC16:1	14	18	4,905 [4,463; 5,478]	5,165 [4,570; 5,575]	0,165	[-0,349;0,679]	0,539
C18:0(SA)	14	18	18,45 [17,81; 19,52]	19,39 [18,41; 20,26]	0,801	[-0,119;1,722]	0,116
TotalC18:1	14	18	18,67 [18,33; 19,04]	19,79 [19,01; 20,67]	1,068	[0,062;2,075]	0,062
C18:2 n-6 (LA)	14	18	12,24 [11,83; 12,78]	11,89 [11,51; 12,72]	-0,086	[-0,857;0,686]	0,831
C18:3n-3 (ALA)	14	18	0,105 [0,088; 0,120]	0,100 [0,100; 0,120]	0,006	[-0,009;0,021]	0,448
C20:0	14	18	0,100 [0,098; 0,110]	0,110[0,110;0,120]	0,011	[0,001;0,022]	0,061
C20:4n-6 (AA)	14	18	2,945 [2,840; 3,140]	2,865 [2,670; 3,033]	-0,156	[-0,345;0,034]	0,135
C20:5n-3 (EPA)	14	18	0,040 [0,030; 0,043]	0,040 [0,040; 0,050]	0,003	[-0,002;0,008]	0,271
C22:0	14	18	0,070 [0,070; 0,080]	0,090 [0,080; 0,100]	0,017	[0,008;0,025]	0,003**
C22:4n-6	14	18	0,815 [0,760; 0,923]	0,765 [0,708; 0,845]	-0,058	[-0,158;0,041]	0,274
C22:5n-6	14	18	1,120 [1,045; 1,333]	1,030 [0,980; 1,198]	-0,09	[-0,224;0,044]	0,214
C22:5n-3 (DPA)	14	18	0,745 [0,678; 0,780]	0,715 [0,680; 0,783]	-0,014	[-0,076;0,048]	0,662
C22:6n-3 (DHA)	14	18	0,320 [0,270; 0,368]	0,310 [0,295; 0,333]	-0,01	[-0,056;0,037]	0,686
C24:0	14	18	0,040 [0,030; 0,060]	0,050 [0,050; 0,060]	0,01	[0,001;0,018]	0,05
C24:1n-9	14	18	0,040 [0,038; 0,050]	0,060 [0,050; 0,060]	0,018	[0,009;0,028]	0,004**
Total AGS	14	18	50,27 [49,86; 51,10]	49,36 [47,91; 50,90]	-0,487	[-1,331;0,357]	0,28
Total AGMI	14	18	25,54 [24,92; 26,17]	27,29 [25,57; 27,92]	0,52	[-0,585;1,624]	0,376
Total n-6 AGPI	14	18	22,59 [22,12; 24,02]	22,25 [20,88; 23,41]	-0,725	[-1,803;0,353]	0,212
Total n-3 AGPI	14	18	1,360 [1,190; 1,403]	1,260 [1,208; 1,360]	-0,048	[-0,138;0,041]	0,312
n-6/n-3 AGPI ratio	14	18	17,46 [16,70; 18,66]	17,57 [16,66; 18,53]	0,075	[-1,241;1,391]	0,913

Tableau C.3 | Profil en acides gras PL des placentas F1 T et E à 28 jours de gestation (% des acides gras totaux)

Les données sont exprimées sous la forme de Médiane[Q1;Q3], en % des acides gras totaux ; AA : C20:4n-6, acide arachidonique ; AGMI : acides gras monoinsaturés; AGPI : acides gras polyinsaturés; AGS : acides gras saturés ; ALA: C18:3n-3, acide alpha-linolénique; DHA : C22:6n-3, acide docosahexaénoïque ; DPA : C22:5n-3, acide docosapentaénoïque ; E : Exposé; EPA : C20:5n-3, acide eicosapentaénoïque ; LA: C18:2n-6, acide linoléique ; PA : C16:0, acide palmitique ; PL : phospholipides; SA: C18:0, acide stéarique; T : Témoin.

Variable	Nomb place	ore de entas	Médiane [Q1; Q3]		Modèle linéaire ajusté		
	Т	Е	Т	Е	βvalue	value IC	
C14:0	15	15	1,640 [1,510; 1,920]	1,400 [1,240; 1,510]	-0,263	[-0,515;-0,01]	0,067
C16:0(PA)	15	15	37,19[36,41;38,23]	37,46 [36,03; 38,73]	-0,094	[-1,81;1,622]	0,916
TotalC16:1	15	15	5,680 [5,520; 6,190]	5,780 [5,280; 6,560]	0,099	[-0,982;1,18]	0,859
C18:0(SA)	15	15	11,75 [10,26; 12,88]	11,68 [10,97; 13,76]	1,084	[-0,858;3,027]	0,295
TotalC18:1	15	15	23,41 [22,60; 24,31]	24,33 [23,02; 25,33]	0,771	[-0,744;2,286]	0,337
C18:2 n-6 (LA)	15	15	8,400 [7,960; 8,670]	8,010 [7,400; 8,750]	-0,117	[-1,001;0,767]	0,798
C18:3n-3 (ALA)	15	15	0,450 [0,400; 0,530]	0,520 [0,480; 0,570]	0,076	[-0,026;0,178]	0,171
C20:3n-6	15	15	4,780 [3,650; 5,660]	3,220 [2,710; 3,650]	-1,518	[-2,382;-0,655]	0,006**
C20:4n-6 (AA)	15	15	1,270 [1,160; 1,570]	1,180 [1,080; 1,350]	-0,119	[-0,311;0,074]	0,25
C20:4n-3	15	15	0,320[0,240;0,360]	0,210 [0,180; 0,240]	-0,09	[-0,142;-0,037]	0,007**
C20:5n-3 (EPA)	15	15	0,080 [0,060; 0,080]	0,060 [0,060; 0,070]	-0,015	[-0,033;0,003]	0,121
C22:4n-6	15	15	0,460 [0,390; 0,500]	0,350 [0,320; 0,390]	-0,105	[-0,163;-0,046]	0,005**
C22:5n-6	15	15	0,160 [0,120; 0,210]	0,120 [0,110; 0,150]	-0,036	[-0,075;0,002]	0,093
C22:5n-3 (DPA)	15	15	0,190 [0,180; 0,230]	0,190 [0,170; 0,210]	-0,023	[-0,06;0,014]	0,251
Total AGS	15	15	52,40 [50,23; 53,65]	51,73 [51,13; 54,84]	0,445	[-1,237;2,127]	0,611
Total AGMI	15	15	29,86 [28,61; 31,61]	32,11 [29,89; 33,21]	1,372	[-0,262;3,007]	0,127
Total n-6 AGPI	15	15	16,44 [15,41; 18,16]	14,48 [13,76; 15,89]	-1,987	[-3,275;-0,698]	0,012*
Total n-3 AGPI	15	15	1,360 [1,240; 1,450]	1,160 [1,120; 1,280]	-0,113	[-0,306;0,079]	0,271
n-6/n-3 AGPI ratio	15	15	12,76 [11,15; 13,96]	12,71 [10,98; 13,40]	-0,207	[-1,997;1,583]	0,824

Tableau C.4 | Profil en acides gras LN des placentas F1 T et E à 28 jours de gestation (% des acides gras totaux)

Les données sont exprimées sous la forme de Médiane[Q1;Q3], en % des acides gras totaux ; AA : C20:4n-6, acide arachidonique ; AGMI : acides gras monoinsaturés; AGPI : acides gras polyinsaturés; AGS : acides gras saturés ; ALA: C18:3n-3, acide alpha-linolénique; DHA : C22:6n-3, acide docosahexaénoïque ; DPA : C22:5n-3, acide docosapentaénoïque ; E : Exposé; EPA : C20:5n-3, acide eicosapentaénoïque ; LA: C18:2n-6, acide linoléique ; PA : C16:0, acide palmitique ; PL : phospholipides; SA: C18:0, acide stéarique; T: Témoin.

Variable	Nomb fœ	ore de tus	re de us Médiane [Q1; Q3]		Modèle linéaire ajusté			
	Т	E	Т	E	βvalue	IC	p-value	
C16:0 (PA)	10	10	39,12 [30,31;43,34]	41,94 [31,10; 43,07]	1,92	[-2,479;6,32]	0,408	
TotalC16:1	10	10	4,975 [3,100; 6,000]	4,680 [2,880; 7,170]	0,364	[-0,424;1,151]	0,382	
C18:0 (SA)	10	10	10,76 [9,662; 12,78]	11,12 [9,133; 14,71]	0,851	[-0,737;2,439]	0,314	
TotalC18:1	10	10	24,42 [21,31; 27,83]	23,06 [22,00; 29,45]	-0,655	[-5,393;4,084]	0,79	
C18:2 n-6 (LA)	10	10	12,57 [10,38; 14,17]	10,90 [9,648; 12,36]	-2,163	[-4,642;0,317]	0,115	
C18:3n-3 (ALA)	10	10	0,560 [0,493; 0,715]	0,475 [0,380; 0,663]	-0,126	[-0,298;0,047]	0,179	
C20:4n-6 (AA)	10	10	2,275 [1,788; 3,875]	2,190 [1,708; 2,638]	-0,614	[-1,479;0,251]	0,19	
C20:5n-3 (EPA)	10	10	0,040 [0,008; 0,155]	0,065 [0,025; 0,125]	-0,007	[-0,07;0,056]	0,832	
C22:4n-6	10	10	0,105 [0,058; 0,248]	0,120[0,090;0,153]	-0,037	[-0,152;0,078]	0,539	
C22:5n-6	10	10	0,170 [0,110; 0,258]	0,200 [0,163; 0,238]	0,007	[-0,064;0,078]	0,855	
C22:5n-3 (DPA)	10	10	0,100 [0,030; 0,170]	0,095 [0,043; 0,180]	-0,024	[-0,136;0,088]	0,678	
C22:6n-3 (DHA)	10	10	0,180 [0,143; 0,450]	0,220 [0,205; 0,388]	0,043	[-0,098;0,185]	0,557	
Total AGS	10	10	51,06 [45,04; 55,64]	53,04 [47,09; 54,84]	2,861	[-2,622;8,344]	0,326	
Total AGMI	10	10	30,44 [28,20; 33,26]	31,44 [28,47; 34,39]	0,165	[-3,543;3,873]	0,932	
Total n-6 AGPI	10	10	16,70 [13,69; 20,99]	15,22 [13,68; 16,66]	-2,974	[-6,355;0,407]	0,112	
Total n-3 AGPI	10	10	1,490 [1,130; 1,833]	1,335 [1,138; 1,588]	0,02	[-0,436;0,475]	0,934	
n-6/n-3 AGPI ratio	10	10	11,95 [10,37; 13,53]	11,73 [10,16; 13,50]	-1,007	[-3,782;1,769]	0,489	

Tableau C.5 | Profil en acides gras du plasma des fœtus F1 T et E à 28 jours de gestation (% des acides gras totaux)

Les données sont exprimées sous la forme de Médiane[Q1;Q3], en % des acides gras totaux ; AA : C20:4n-6, acide arachidonique ; AGMI : acides gras monoinsaturés; AGPI : acides gras polyinsaturés; AGS : acides gras saturés ; ALA: C18:3n-3, acide alpha-linolénique; DHA : C22:6n-3, acide docosahexaénoïque ; DPA : C22:5n-3, acide docosapentaénoïque ; E : Exposé; EPA : C20:5n-3, acide eicosapentaénoïque ; LA: C18:2n-6, acide linoléique ; PA : C16:0, acide palmitique ; PL : phospholipides; SA: C18:0, acide stéarique; T : Témoin.

analyses en composante principale (ACP) ont confirmés ces résultats, toutefois aucune signature spécifique en acides gras n'a été mise en évidence pour permettre de distinguer les deux groupes de lapines Fo (**Annexe 5**).

Au niveau des phospholipides placentaires F1, une diminution significative de la proportion en C16:0 et une augmentation significative des proportions en C22:0 et en C24:1n-9 ont été observées (**Tableau C.3**). L'ACP a confirmé ces analyses statistiques et a permis de montrer que les phospholipides placentaires F1 présentaient des profils en acides gras significativement différents permettant de distinguer les membranes placentaires en fonction de l'exposition *in utero* (**Annexe 6**).

Concernant la fraction des lipides neutres des placentas F1, peu de différences ont été observées *via* l'analyse statistique de chaque acide gras pris individuellement (**Tableau C.4**). L'exposition maternelle pendant la gestation a entrainé une diminution des proportions de C20:3n-6 (DGLA, acide di-homo-gamma linolénique), de C20:4n-3 et de C22:4n-6. L'ACP du profil en acides gras des lipides neutres a confirmé ces différences qui ne suffisent toutefois pas à distinguer les deux groupes de placentas (**Annexe 7**).

Les plasmas des fœtus F1 ne présentent aucune différence significative pour les acides gras des profils pris individuellement (**Tableau C.5**), seuls des différences relevant du dimorphisme sexuel et des réponses sexe-spécifiques telle qu'une augmentation de la proportion en C22:0 et en C20:1 observée plus particulièrement chez les femelles exposées. Les ACP ont confirmé ces résultats mais ne mettent en évidence aucun profil spécifique en acides gras permettant de distinguer les fœtus F1 exposés ou non (**Annexe 8**).

2.1.2. Discussion

Les plasmas des lapines Fo exposées au gaz d'échappement de moteur diesel ne présentent pas (ou peu) de différence en acides gras, que ce soit quantitativement (concentration similaire) ou qualitativement. Ces résultats sont assez attendus puisque les lapines ont toutes reçu le même régime alimentaire. De plus, il faut garder à l'esprit que ces lapines sont en fin de gestation avec un métabolisme lipidique adapté pour permettre un apport accru d'acides gras au fœtus en fin de développement. Les différences de leur profil en acides gras sont minimes, les deux seuls acides gras dont la

teneur est significativement perturbée ne représentent qu'une faible part du profil et leurs fluctuations individuelles n'ont pas de rôle biologique connu.

Concernant la fraction phospholipides des placentas F1, représentatifs des membranes cellulaires, la diminution significative de la concentration en acides gras est cohérente avec les données obtenues grâce à l'approche histologique et son analyse par stéréologie, qui avait démontré une diminution du volume relatif des vaisseaux fœtaux et des cellules trophoblastiques. Pour les lipides neutres, représentatifs du stockage de lipides intracellulaires, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour la concentration en acides gras. Cependant, qualitativement, le profil en acides gras des lipides neutres est perturbé avec une diminution du DGLA (C20:3n-6) et consécutivement du C22:4n-6 sans modification de la proportion de l'acide linoléique (LA, précurseur) ni de l'acide arachidonique (AA, métabolite supérieur). Nous pourrions émettre l'hypothèse que la baisse de la proportion en DGLA dans les stocks placentaires pourrait refléter une plus grande production endogène de molécules anti-inflammatoires, suggérant une adaptation face à une augmentation de l'inflammation bas-grade chez les animaux exposés. En effet, le DGLA joue un rôle de précurseur des prostaglandines (PGE1) et des thomboxanes (TXA1) de série 1 grâce à l'action de l'enzyme COX. Ces eicosanoïdes sont des molécules anti-inflammatoires, elles induisent la vasodilatation et inhibent l'agrégation des plaquettes. De plus, l'enzyme 15-LOX catalyse la transformation du DGLA en acide 15-hydroxyeicosatriénoique (15-HETrE). Le 15-HETrE est un inhibiteur puissant de l'enzyme 5-LOX qui est responsable de la conversion de l'AA en Leucotriène B4 (LTB4). LTB4 est une molécule inflammatoire puissante via son action sur les neutrophiles. Donc le DGLA sert à inhiber l'inflammation via la voie des eicosanoïdes (King 1996-2016).

Aucun profil spécifique en acides gras n'a été observé pour le plasma des fœtus F1 exposés par rapport aux témoins, lesquels présentaient par ailleurs un phénotype biométrique altéré avec une diminution de la longueur de la tête et du périmètre abdominal. Les profils en acides gras peu différents dans les placentas et similaires pour les fœtus avec cependant des perturbations de la croissance fœtale pourraient indiquer qu'il n'y a pas eut d'adaptations placentaires permettant un apport suffisant en acides gras pour une croissance optimale. Les acides gras, particulièrement les AGPI, sont essentiels au développement fœtal (Cetin *et al.* 2009). Des adaptations du métabolisme des acides gras ont pu être mises en place plus tôt dans la gestation et participer au

Population	Voie de signalisation	Nombre de gènes annotés	Nombre de gènes de « Enrichment Core »	SEN	FDR q- value
Exposé	Nitrogen metabolism	17	5	1.62	0.183
Contrôle	Homologous recombination	19	7	-1.74	0.242

Tableau C.6 | Analyse d'enrichissement (GSEA) – Base de données C2:KEGG

FDR: False Discovery Rate; SEN: Score d'Enrichissement Normalisé.

Tableau C.7 | Analyse d'enrichissement (GSEA) – Base de données C5:BP

Population	Voie de signalisation	Nombre de gènes annotés	Nombre de gènes de « Enrichment Core »	SEN	FDR q- value
	RNA splicing via transesterification reactions	26	15	1.8	0.201
Exposé	Regulation of cell growth	38	8	1.69	0.234
	RNA splicing	58	29	1.69	0.184
	Positive regulation of MAP kinase activity	38	20	-1.97	0.045
	Activation of MAPK activity	34	18	-1.92	0.042
	Regulation of MAP kinase activity	52	24	-1.88	0.051
	Monocarboxylic acid metabolic process	57	29	-1.80	0.107
	Fatty acid metabolic process	38	19	-1.78	0.109
	Regulation of neurotransmitter levels	19	14	-1.77	0.104
Contrôlo	Anion transport	18	7	-1.72	0.142
Controle	Positive regulation of transferase activity	66	33	-1.70	0.162
	Regulation of heart contraction	16	5	-1.67	0.207
	Regulation of JNK activity	16	5	-1.67	0.191
	M phase of mitotic cell cycle	62	21	-1.66	0.178
	Mitosis	60	21	-1.66	0.171
	M phase	85	28	-1.63	0.210
	Establishment and/or maintenance of cell polarity	15	8	-1.62	0.211

FDR: False Discovery Rate; SEN: Score d'Enrichissement Normalisé.

Tableau C.8 | Analyse d'enrichissement (GSEA) – Base de données C5:MF

Population	Voie de signalisation	Nombre de gènes annotés	Nombre de gènes de « Enrichment Core »	SEN	FDR q- value
Contrôle	Amino acid transmembrane transporter activity	25	9	-1.86	0.082

FDR: False Discovery Rate; SEN: Score d'Enrichissement Normalisé.

maintien d'une croissance normale jusqu'à 21 jpc, mais ne semblent pas être la voie la plus probable pour expliquer les signes d'hypotrophie fœtales observées en fin de gestation.

2.2. Expression génique placentaire

L'expression génique placentaire a été analysée afin d'étudier les perturbations d'expression génique à ce stade pouvant expliquer les effets délétères de l'exposition maternelle.

2.2.1. Différentiel d'expression génique et enrichissements de voies de signalisation dans les placentas à 28 jpc

L'analyse différentielle de l'expression génique de plus de 12000 gènes n'a pas permis de mettre en évidence une différence entre les deux groupes. Cette analyse différentielle, gène par gène, est très efficace pour des perturbations qui ont un effet majeur sur l'expression génique. Cependant, ce type d'approche devient inefficace face à des perturbations subtiles (Subramanian *et al.* 2005; Weidner *et al.* 2016). Une seconde analyse a été réalisée à l'aide de l'application *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) qui analyse des milliers de transcrits potentiellement impliqués dans la régulation de fonctions physiologiques ou cellulaires. Cette approche met en évidence de fines modifications d'expression génique au sein d'un réseau de gènes.

Dans le groupe pollué, l'analyse d'enrichissement sur les bases de données KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) et GO (*Gene Ontology*, BP pour les processus biologiques, CC pour les composants cellulaires et MF pour les fonctions moléculaires) a permis de mettre en évidence quatre voies de signalisation significativement enrichies (**Tableau C.6, C.7 et C.8**). Ces quatre réseaux incluent trois réseaux de la base de données C5:BP concernant l'épissage de l'ARN («*RNA splicing*» et «*RNA splicing via transesterification reactions*») et la régulation négative de la croissance cellulaire («*Regulation of cell growth*») ainsi qu'un réseau de la base C2 :KEGG qui est le métabolisme de l'azote («*Nitrogen metabolism*»), spécifiquement les anhydrases carboniques qui sont responsables de la transformation du dioxyde de carbone en hydrogénocarbonate et proton H⁺ dans les érythrocytes (**Figure C.5**).

Dans le groupe témoin, l'analyse d'enrichissement sur les quatre mêmes bases de données a permis de mettre en évidence 16 voies de signalisation significativement



Figure C.1 | Analyse d'enrichissement (GSEA) sur les placentas F1 à 28 jpc

(a) « Enrichment plot » de l'analyse GSEA du réseau le plus négativement enrichi: « Positive regulation of MAP kinase activity ». (b) « Enrichment plot » de l'analyse GSEA du réseau le plus positivement enrichi: « RNA splicing via transesterification reactions ». (c) Histogrammes présentant les 15 réseaux de gènes les plus négativement enrichis, contenant plusieurs bases de données C2CP:KEGG (Orange), C5:BP (Vert) et C5:MF (Rouge). (d) Histogrammes présentant les 4 réseaux de gènes positivement enrichis, contenant plusieurs bases de données C2CP:KEGG (Vert).

enrichies (i.e. répression de ces fonctions dans le groupe pollué), incluant un réseau de la base C2:KEGG, 14 réseaux de la base C5:BP et un de la base C5:MF (**Tableau C.6, C.7 et C.8**). Les quinze premiers réseaux concernent la régulation de l'activité des MAP kinases (« *Positive regulation/Activation/Regulation MAP kinase activity* »), le transport transmembranaire des acides aminés (« *Amino acid transmembrane transporter activity* »), le métabolisme des acides gras (« *Fatty acid metabolic process* ») et des acides monocarboxyliques (« *Monocarboxylique acid metabolic process* »), la recombinaison homologue (« *Homologous recombination* », importante dans la réparation des cassures d'ADN), le transport d'anion (« *Anion transport* ») et la mitose (« *M phase mitotic cell cycle* », « *Mitosis* » et « *M phase* ») (**Figure C.5**).

2.2.2. Discussion

Très peu de voies de signalisation sont enrichies dans le groupe pollué par rapport au témoin. Ces réseaux de gènes sont impliqués dans l'épissage des ARN, la croissance cellulaire et le métabolisme de l'azote. Cependant, un plus grand nombre de réseaux de gènes sont enrichis dans le groupe témoin signifiant une répression de ces fonctions dans le groupe pollué. Ces voies de signalisation concernent la régulation des voies de signalisation impliquant la régulation de la mitose, les MAP kinase (*Mitogen-Activated Protein*), le transport transmembranaire des acides aminés et le métabolisme des acides gras.

Les gènes exprimés dans les deux réseaux qui concernent l'épissage codent pour des protéines impliquées dans la formation du splicéosome, complexe dynamique permettant l'excision des introns, des régions non codantes de l'ARN pré-messager et la suture de ses exons. L'épissage fait partie des mécanismes qui peuvent réguler l'expression des gènes. Une dérégulation de l'épissage pourrait conduire à des mutations et rendre l'individu susceptible de développer certaines pathologies, telles que la dysautonomie familiale, la neurofibromatose de type 1 ou l'amyotrophie spinale (Ward & Cooper 2010). Cette dérégulation pourrait être impliquée dans la programmation développementale de perturbations métaboliques observées chez les individus F1 adultes.

Les gènes exprimés dans le réseau « *Regulation of cell growth* » codent pour des protéines impliquées dans la régulation négative ou « *downregulation* » de la croissance

cellulaire. La surexpression des gènes CDKN2D (cyclin dependent kinase inhibitor 2D) et CDKN2AIP (cyclin dependent kinase inhibitor 2A interacting protein) entraine un arrêt de la croissance cellulaire et induit le déclenchement prématuré d'un processus de sénescence via la voie de signalisation de la p53 (Miranda-Sayago et al. 2012; Singh et al. 2014). De plus, la protéine CDKN1B (cyclin dependent kinase inhibitor 1B) est un inhibiteur de la cycline E/A-CDK2 et une augmentation de son expression entrainerait une pause dans la transcription des gènes nécessaires à la progression en phase S du cycle mitotique (Hnit et al. 2015). Cette inhibition pourrait être corrélée à la répression des réseaux de gènes impliqués dans la mitose. Les gènes des trois réseaux concernant la mitose, réprimés chez les exposés, codent pour des protéines impliquées dans l'alignement des chromosomes avec des protéines du cytosquelette, dans la survie, la prolifération et la migration cellulaire. Une sous-expression de ces gènes pourrait entrainer une diminution de la prolifération cellulaire (Jiang & Tang 2015). Ces dérégulations négatives de la croissance cellulaire pourraient en partie expliquer la diminution du volume relatif des cellules trophoblastiques démontrée par stéréologie dans les placentas F1. De plus, une étude a montré qu'une exposition aux particules diesel in vitro induisait une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse à un stress, parmi lesquels on trouve OKL38, présent dans le réseau de régulation de croissance cellulaire enrichi dans le groupe pollué de notre étude (Li et al. 2010a). Ce gène OKL38 est impliqué dans le stress oxydatif et régule l'apoptose. L'apoptose n'a pas été étudiée dans les placentas F1 de notre étude, cependant nous pourrions avancer l'hypothèse d'une augmentation de l'apoptose des cellules trophoblastiques comme cela a été montré chez la femme exposée à la fumée de cigarette (Votavova et al. 2012). Enfin, les voies de signalisation des MAP kinases sont réprimées dans les placentas pollués, or ces protéines sont impliquées dans un grand nombre de processus comme la prolifération cellulaire et la régulation de l'expression de VEGF (Boutros & Byrne 2005; Eto et al. 2009). Leurs sous-expressions pourraient soutenir l'hypothèse de la régulation négative de la prolifération des cellules trophoblastiques et participer à la dérégulation de l'expression de VEGF, entrainant des défauts de vascularisation comme démontré par les échographies et la stéréologie.

Le réseau « Nitrogen metabolism » est composé de gènes codant pour les anhydrases carboniques qui sont fortement exprimées dans les érythrocytes et qui catalysent la réaction de l'hydratation du dioxyde de carbone en hydrogénocarbonate

(HCO₃⁻) et proton H⁺ (Dzik 2011). L'augmentation de l'expression de ces enzymes pourrait être causée par une nécessité de prendre en charge l'augmentation de la concentration en dioxyde de carbone présent dans la fraction volatile des gaz d'échappement de moteur diesel. Cependant aucune mesure des gaz sanguins n'a été effectuée pour confirmer cette hypothèse.

La répression du réseau des transporteurs transmembranaires des acides aminés pourrait entrainer une diminution du transport des acides aminés, essentiels à la croissance fœto-placentaire (Regnault *et al.* 2005). Cette sous-expression est cohérente avec les signes d'hypotrophie fœtale observée chez les fœtus F1 exposés au gaz d'échappement de moteur diesel.

Enfin, les gènes du réseau du métabolisme des acides gras codent pour des enzymes catalysant la formation des différents acides gras et leur métabolisme. La répression de ce réseau pourrait expliquer les différences mineures retrouvées au niveau des profils en acides gras dans les placentas du groupe pollué (voir **C§1.1.**).

L'expression génique placentaire F1 est peu dérégulée par l'exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel. Cependant il faut garder à l'esprit que le stade étudié est 28 jpc, c'est-à-dire quelques jours avant le terme. Nous n'avons donc pas de visibilité sur la cinétique d'expression génique au cours de la gestation. Des adaptations fonctionnelles peuvent avoir eu lieu au cours de la gestation, ce qui pourrait en partie expliquer le fait qu'aucune différence de croissance fœto-placentaire n'est observée à 21 jpc alors qu'à mi-gestation des signes de retard de croissance étaient visibles. Ce type d'adaptations placentaires fonctionnelles transitoires a été rencontré chez la souris en cas d'obésité maternelle où un retard de croissance initialement observé à mi-gestation est compensé par la surexpression des transporteurs de nutriments placentaires (Sferruzzi-Perri *et al.* 2013).

Les effets sur l'expression génique observés à 28 jpc pourraient en partie expliquer les dérégulations structurales observées par stéréologie, les différences de profils en acides gras et les signes de retard de croissance constatés à ce stade.

3. Article 2: *In utero* exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function, fatty acids profile and fetal metabolism of the second generation in rabbits

Valentino S.A.*, Ralliard-Rousseau D.*, Aubrière M-C., Dahirel M., Lallemand M-S., Archilla C., Jouneau L., Mourier E., Richard C., Fournier N., Guinot M., Aioun J., Camous S., Slama R., Duranthon V., Cassee F.R., Couturier-Tarrade A., Chavatte-Palmer P. *Co-premiers auteurs

En préparation pour une soumission dans PLOS One.

Cet article présente les résultats de l'étude spécifique du développement fœtoplacentaire F2 au travers d'analyses menées principalement sur les placentas F2, mais portant également sur les compartiments maternels F1 et fœtaux F2. L'analyse de la biochimie sanguine maternelle des lapines F1 en gestation et des fœtus F2, a été complétée par la détermination des profils en acides gras des plasmas maternels, et des plasmas des fœtus F2, ainsi que des différentes fractions placentaires (membranes et stockages lipidiques intracellulaires). Les placentas ont également fait l'objet d'analyse structurale (histologie-stéréologie) et fonctionnelle par des approches transcriptomiques avec une analyse de la modulation de réseaux de gènes (Gene Set Enrichment Analysis). Les validations par RT-qPCR des données de transcriptomique sont en cours. Les analyses par GSEA ont été réalisées très récemment et nous ne nous sommes focalisés pour l'instant que sur quelques-uns des réseaux de gènes (ou famille de réseaux de gènes), et l'exploration de ces données demandent encore à être approfondie.

Nous n'expliquons pas pour l'instant certains de nos résultats, ce qui nous amène à envisager des expériences complémentaires. C'est notamment le cas des diminutions de cholestérol et non-HDL cholestérol plasmatiques observées chez les fœtus F2 exposés pour lesquelles nous avons émis plusieurs hypothèses qui demandent à être vérifiées. Cette diminution de cholestérol circulant pourrait provenir d'une activation de la stéroïdogenèse dans les surrénales fœtales induisant une augmentation de la concentration en cortisol, impliqué dans la maturation cérébrale fœtale. Nous pourrions

donc envisager un dosage de cortisol dans les plasmas des fœtus F2. Cette activation de la stéroïdogenèse pourrait aussi conduire à une augmentation du DHEAS (déhydroépiandrostérone sulfate) dans les surrénales fœtales, lequel serait alors transféré au placenta pour la production d'œstrogènes. Cependant, chez le lapin, il n'y aurait pas de relais placentaire, puisque c'est le corps jaune qui est décrit pour le maintien de la gestation par la production de progestérone et d'œstrogènes (Martensson 1984; Miller 1998). La deuxième hypothèse est que cette diminution de cholestérol et non-HDL cholestérol circulant pourrait provenir d'un défaut de transfert transplacentaire. Pour valider cette hypothèse et infirmer la première, nous pourrions envisager un dosage par chromatographie en phase gazeuse du cholestérol et des esters de cholestérol dans les placentas.

Enfin, les données de stéréologie doivent être confirmées et complétées avant la soumission, par l'analyse d'un plus grand nombre de placentas pour atteindre un effectif satisfaisant (6 supplémentaires par groupe).

A la lumière de ces futurs résultats et des hypothèses que nous allons pouvoir valider et émettre, la discussion de cet article évoluera donc probablement d'ici sa soumission dans PLOS One. En cas de soumission de ce papier, la nouvelle version de l'article vous sera fournie au moment de la soutenance.
In utero exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function, fatty acids profile and fetal metabolism of the second generation in rabbits

Valentino S.A.¶^{1,2}, Rousseau-Ralliard D.¶^{1,2}, Aubrière M-C.^{1,2}, Dahirel M.^{1,2}, Lallemand M-S.^{1,2}, Archilla C.¹, Jouneau L.¹, Mourier E.^{1,2}, Richard C.^{1,2}, Fournier N.^{3,4}, Guinot M.^{1,2}, Aioun J.^{1,2}, Camous S.^{1,2}, Slama R.⁵, Duranthon V.¹, Cassee F.R.^{6,7}, Couturier-Tarrade A.^{1,2}, Chavatte-Palmer P.^{1,2}

1 UMR BDR, INRA, ENVA, Université Parus Saclay, 78350, Jouy en Josas, France

- 2 PremUp Foundation, Paris, France
- 3 Univ Paris-Sud, EA 4041/4529 Lip (Sys)2, UFR de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

4 Hôpital Européen Georges Pompidou (AP-HP), Laboratoire de Biochimie, UF Cardio-Vasculaire, Paris, France

5 Inserm and Univ. Grenoble Alpes, U823, IAB Research Center, -Team of Environmental Epidemiology Applied to Reproduction and Respiratory Health, Grenoble, France

6 Centre for Sustainability, Environment and Health, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands

7 Institute of Risk Assessment Sciences, Utrecht University, Utrecht, Netherlands.

 \P Co-first authors

Corresponding author.

Pascale CHAVATTE-PALMER (pascale.chavatte@jouy.inra.fr),

Abstract

Atmospheric pollution is a rising concern in urban areas and a major contributor to people's mortality. So far, little is known about the intergenerational effects of *in utero* exposure. Our aim was to evaluate the effects of exposure of pregnant females to diluted DE on feto-placental development in the second generation.

Pregnant female rabbits (F0) were exposed to diluted (1mg/m3) and filtered DE (nanoparticle (NP) diameter \approx 69nm) (E: exposed group) or clean air (C: Control group) for 2h/day, 5days/week by nose-only exposure from 3 to 27 days postconception (dpc). Offspring (F1) were not exposed to DE. F1 females were mated with control males at adulthood. Second generation (F2) feto-placental units were collected at 28 dpc from F1 females. Fatty acid (FA) profiles (plasma and placenta) were analyzed by gas chromatography and differential profiles between the two groups were determined through Principal Component Analysis. Identification of biological pathways enriched in genes associated with grandmother exposure was performed using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), from placental transcriptomic data.

At 28 dpc, there was no difference for maternal F1 biochemistry between groups although total hepatic neutral lipid (NL) contents were significantly increased in F1 E females. In placentas (F2), total NL concentration was increased in the E group mostly with monounsaturated fatty acids while arachidonic acid (AA, pro-inflammatory precursor) was proportionally reduced. In fetal plasma (F2), the proportion of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA, precursors of anti-inflammatory molecules) was increased and that of AA decreased in E compared to C fetal plasma. Using stereological approaches, no structural difference was observed in placentas between groups. Nevertheless, GSEA analyses of transcriptomic data showed that proteasome complex and ubiquitin pathways, involved in

protein degradation, were enriched in E versus C placentas. On the opposite, ion channel and inflammation regulation pathways were enriched in C compared to E.

In conclusion, in utero exposure of F1 females to DE can affect placental function and fetal metabolism in their F2 offspring. Placental FA profiles suggest adaptive protective mechanisms against inflammation, through the placental storage of non essential FA and the favored transplacental transfer of n-3 PUFA. The physiological consequences of observed alterations in placental genes involved in protein metabolism and intracellular signaling remain to be determined. These effects most likely result from altered *in utero* development of maternal F1 gametes.

Keywords: intergenerational study, diesel exhaust, gestational exposure, placenta, fatty acids, transcriptomics, GSEA.

Introduction

In the recent years, air pollution has become a major health concern in developed and developing countries for all population categories. Many studies in humans and animals have linked reduced fetal growth and detrimental birth and even long term offspring outcomes to in utero exposure to air pollutants (Pereira et al. 1998; Veras et al. 2008; Veras et al. 2009; Ritz et al. 2011; Lakshmi et al. 2013; Weldy et al. 2014), among those our recent publication (Valentino et al 2016). Altogether, epidemiological and experimental studies show that placental function is, like respiratory and cardiovascular function, affected by air pollutants through inflammation and oxidative stress, among others. Consequences of maternal exposure to diesel engine exhaust (DE) during gestation begin to be known even if the comparison between studies is complicated due to different exposure technique, windows of exposure or particle concentration. Little is known about intergenerational effects of DE exposure. Some studies in rodents showed that maternal (F0) exposure to DE or nanoparticles altered first generation (F1) male reproductive function individuals with decreased daily sperm production and altered steroidogenesis (Ono et al. 2008; Hemmingsen et al. 2009; Li et al. 2009). F1 female reproductive function could be affected by maternal exposure to DE with a decrease in number of primordial and primary follicles (Ogliari et al. 2013). These deregulations suggest an impact on the second generation. Thus, in rats, protein restriction during F0 gestation induced metabolic deregulations with disturbed glucose metabolism and insulin resistance in both F1 and F2 generation associated with overexpression of genes implicated in glucose metabolism and oxidative stress (Hanafi et al. 2016). Moreover, one brasilian study showed that in mice, continuous polluted air exposure over 3 generations altered F2 female fertility, increased fetal abortions, decreased F3 fetal weight and altered placental structure.

In order to evaluate the intergenerational effects up to the F2 generation of *in utero* F1 exposure to DE, we chose the rabbit model because its placenta is a hemodichorial and

labyrinthine placenta close to that of villous and hemochorial human placenta (Furukawa et al. 2014). In this study, F1 female generation was called C for controls and E for exposed (exposure during in utero life only) and F2 generation was called CC for controls and EC for fetuses issued of F1 E female rabbit (i.e., first letter represents F0 gestation and second letter represents F1 gestation, and C: Control and E: Exposed). The present study is the immediate continuation of our recently published history interested in the effects of air pollution exposure of rabbit female F0 during gestation on F1 (direct effects) and F2 (indirect effects) feto-placental development (Valentino et al 2016). As a remainder and as described earlier, the F2 fetoplacental biometry was not disturbed consecutively to the in utero exposure of the F1 generation (Valentino et al. 2016). But these apparently normal F2 EC fetuses presented decreased plasma total cholesterol (-25.9%, p=0.008) and non-HDL cholesterol (-26%, p=0.007), but increased plasma triglycerids concentrations (+25.9%, p=0.015) compared to F2 CC controls (Valentino et al. 2016). These biochemical differences observed in the F2 fetal plasma drove us to explore more accurately the F2 placenta, at a biochemical and molecular levels, in order to understand to what extend the roles of the placenta and its possible adaptive regulations have ensured an apparently normal, but not perfect, fetal development.

Methods

Ethics. The local ethical committee (N°45 in the French National register) approved the experimentation under N°12/102.

Animals. As described in Valentino *et al.*, F0 pregnant New Zealand white female rabbits (INRA1077 line) were exposed by nose-only inhalation to diluted DE with a concentration of 1mg/m^3 for 2hr/day and 5days/week, from the 3^{rd} to the 27^{th} day post-conception (dpc) (Valentino *et al.* 2016). Sixteen females (N=7 Controls (C), N=9 Exposed (E)) gave birth to F1 offspring, which were raised in control conditions. At 6.5 months of age, F1 females (N=3 Controls, N=9 *in utero* Exposed) were mated to males from breeding and euthanized at 28dpc to collect and weigh F2 (second generation, N= 21 CC and N= 87 EC) feto-placental units, maternal and fetal plasma were collected. Fetuses were weighed; fetal length (crown to rump), fetal head (biparietal diameter and head length) and abdominal diameters were measured prior to dissection. Head measurements were performed using a digital caliper. Fetuses were sexed by visual observation of the internal genital organs. The rabbit placenta is made of three compartments: the decidua (maternal origin), the junctional zone and the labyrinthine area, which is the materno-fetal exchanges zone with fetal origin. At 28 dpc, functional zones of the placenta (the labyrinth, the junctional zone and the deciduas) were dissected out.

Biochemistry. Classical biochemistry (triglycerides, cholesterol, glycemia, urea, creatinin, ASAT, ALAT) was performed on maternal and fetal EDTA-plasma on a classical automaton biochemistry analyzer (DXc800 Beckman Coulter equipment) and insulin by chemiluminescent immunoassay using paramagnetic particles on automaton analyzer (DXi Beckman Coulter equipment).

Fatty acids (FA) analysis. 100µL of maternal plasma (n=3 C and 9 E), 100 µL of fetal plasma (n=12 C and 12 E) as well as 300mg of labyrinthine area (n=12 CC and 12 EC) from each conceptus were used for lipid analysis. After classical lipid extraction of plasma (Folch et al. 1957), fatty acids (FA) were transmethylated with BF3-methanol and the FA Methyl Esters were analyzed by Gas Chromatography-FID (GC 3900 Varian, France) on an Econo-Cap EC-WAX capillary column (Tarrade et al. 2013). After lipid extraction of placental tissue, the phospholipids (tissue membranes) were separated from neutral lipids (intracellular lipid store) using silica acid cartridges (Supelco, Bellefonte, PA) according to Juaneda et al (Juaneda & Rocquelin 1985) prior transmethylation of the FA from these two fractions. Identification of FA was made in reference to known FA profile obtained from injection of standard FAME (FA methyl esters) mix (Supelco 37 components FAME mix, ref 47885-U, Sigma). The FA profile was established for each sample, and expressed as % of total FA. Heptadecanoic acid (C17:0), introduced prior the plasma lipid extraction (50µg) or prior the FA transmethylation of placental PL and NL fractions (200µg), was used as internal standard to establish the total FA concentration of plasma or a relative FA quantification of each placental lipid fraction after chromatogram analysis. The chromatographic analyses allowed the identification of the following FA: C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, C14:1, C15:1, C16:1n-9, C16:1n-7, C18:1n-9, C18:1n-7, C20:1n-9, C20:1n-7, C22:1n-9, C24:1n-9, C18:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-3, C20:2n-6, C20:3n-3, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:2n-6, C22:4n-6, C22:5n-6, C22:5n-3, C22:6n-3 (Supplemental Table S1). Only a few relevant FA are reported in the result tables but all are considered in the totals and complementary Principal Component Analyses performed on these FA profiles (cf. Statistics).

Classical histology. Pieces of maternal liver were fixed in a 4% formaldehyde solution in PBS for at least 10 days, prior to be dehydrated in ethanol solutions, cleared in butanol,

embedded in paraffin and then cut into 5 µm thick sections (Leica microtome, Germany). Four different colorations were performed on the liver sections: a routine HES coloration (Hematoxyline Eosine Safran) to reveal the different cellular components, a Perl's coloration (Prussian blue coloration) to highlight possible ferric deposits, a Masson Trichrome coloration (Microm Microtech, France) to underline the collagen fibers, and a PAS (Periodic Acid Schiff) to highlight the presence of glycogen. All the colored sections were analyzed under light microscopy and scanned using a Nanozoomer Digital Pathology System (NDP Scan U10074-01, Hamamatsu, Japan).

Immunohistochemistry. The hemodichorial and labyrinthine rabbit placenta is made of three compartments: the decidua (maternal origin), the junctional zone and the labyrinthine area, which is the materno-fetal exchanges zone with fetal origin. Samples of labyrinthine area were fixed with formalin. After dehydration in ethanol solutions and washing in xylene, pieces were embedded in paraffin and then cut into 7 μ m thick sections (Leica microtome, Germany). Immunodetection of vimentin was performed in order to label fetal capillaries on placental sections from the two groups (N=6 CC and N=6 EC placentas) as described previously (Tarrade *et al.* 2014b).

Stereological analysis. The cellular composition of the labyrinthine area was explored by stereology. After vimentin immunodetection, all placental sections were scanned using a NanoZoomer Digital Pathology System (NDP Scan U100074-01, Hamamatsu, Japan) as previously described (Tarrade *et al.* 2013). Volume fraction and surface density of trophoblast, fetal vessels and maternal blood space, i.e. the components of the labyrinthine area, were quantified using the One Stop Stereology method available on the Mercator® software, as described previously (Favaron *et al.* 2013).

RT-qPCR. Pieces of labyrinthine area randomly chosen from each of the control (n=12) and the exposed litters (n=12), were frozen in liquid nitrogen and RNA was extracted twice in 3M sodium acetate pH 4-5, aquaphenol and chloroform/isoamylic ethanol (24:1), then precipited in isopropanol at -80°C overnight. The pellet was recovered in D+ solution and RNA precipitated in isopropanol at -80°C overnight. The RNA pellet was washed with ethanol, dried and solubilized in RNase-free water. RNA was purified with Qiagen kit (RNeasy Mini kit, Qiagen). Reverse transcription was performed with 1µg of RNA and using the BioRad kit. The quantitative PCR reactions were carried out with SYBR green on a StepOnePlus (Applied Biosystems). Preliminary study on gene expression in the placenta was performed with gene candidate approach with analysis of several genes disturbed in case of growth retardation (*ABCA1*, *ABCG1*, *CD36*, *HMG*, *LDL-R*, *LXRa*, *PPARy*, *SLC38A1*, *SLC38A2*, *SLC38A4*, *SLC2A3*).

Transcriptomic analysis. RNA extracted for gene candidate approach with RT-qPCR were then amplified (n=8 for controls and n=8 for exposed) and marked with the Agilent kit (One color Microarray-based Gene Expression Analysis low input Quick Amp labeling, Agilent and One color spike mix, Agilent). Samples were hybridized and deposited on the Rabbit Custom Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies, design ID: 042421) for transcriptomic analysis (12775 genes) (Jacquier *et al.* 2015).

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). The usual strategy to analyze transcriptomics is based on a single-gene level that is very efficient for perturbations that exert large impacts on individual genes. But this conventional approach becomes inefficient with subtle exposures because they make use of only a minor fraction of the information contained in wholegenome transcriptomic datasets, because of arbitrary threshold used (Weidner *et al.* 2016).

Gene set enrichment analysis (GSEA), which was established for use in metabolic studies in the 2000s (Subramanian *et al.* 2005) first maps all detected unfiltered transcripts to the intended pathways (or other "sets of interest") to allow the analysis of thousands of transcripts potentially involved in the concerted regulation of specific pathways, including moderately regulated (and non-regulated) genes usually lost due to experimental background noise. The GSEA approach (Subramanian *et al.* 2005) was used to systematically analyze the transcriptomic data modulation and identify biological pathways enriched in genes associated with the grandmother exposure. GSEA was performed with the following parameters: 1,000 gene set permutations, weighted enrichment statistics, gene set size between 15 and 500, and signal-to-noise metrics. Regulated pathways were considered statistically significant if the false discovery rate (FDR) q-value was < 0.25. The GSEA-derived normalized enrichment score was used for the visualization of pathway regulation. C2:KEGG (The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), C5:BP (Biological Processes), C5:CC (Cellular Component) and C5:MF (Molecular Function) databases (de Tayrac *et al.* 2009) were used to identify the top 15 pathways characterizing each group.

Statistical analysis. Data are expressed as: median[Q1; Q3], with first (Q1) and third quartile (Q3) corresponding to 25 and 75% of scores, respectively. For all F1 maternal data a linear model was used, with random effect of dams adjusted for treatment, birth date (3 series of birth), number of F1 individuals at birth and at weaning using the linear mixed effects model (nlme package, R, Pinheiro, Bates, DebRoy, Sarkar and the R Development Core Team 2013. nlme. R package version 3.1-111; <u>http://www.r-project.org/</u>). The β -value represents sample variability after adjustment. A negative β -value represents a reduction in exposed group and a positive β -value represents an increase in exposed group compared to controls. Similar linear model was used for F2 fetal data with random effect of dams adjusted for treatment, litter

size, fetal position in the horn (indexed in 3 categories) and fetal sex. Fetal sex effects were analyzed; however the sample size was too short in order to discuss correctly these effects. For fatty acids profiles, linear mixed models identical to that used for maternal and fetal data were used to analyze each fatty acid for each profile. Principal Component Analysis (PCA) was performed using FactoMineR, an R package (Le *et al.* 2008) dedicated to multivariate data analysis(de Tayrac *et al.* 2009) to analyze the biological relevance of the statistical differences observed using the linear model. Differential placental gene expression analysis was performed using limma package and p-values and the Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) were calculated to statistically test the measured differential expression.

Results

Maternal biochemistry at 28 dpc

The tested parameters were the same in the dams as in the fetuses done previously (Valentino *et al.* 2016). In contrast with what was found in the fetus, there was no significant difference for any parameters in the dams (**Supplemental Table S2**).

Placental stereology

No change in F2 fetal and placental weights was reported previously (Valentino et al 2016). The cellular composition of the labyrinthine area was further explored by stereology (**Supplemental Figure S1**). At 28 dpc, there was no significant difference between the two groups on the relative volume and surface of maternal blood space, trophoblast and fetal vessels (**Supplemental Table S3**).

Fatty acids profile

Fatty acid concentrations in plasma and tissue

Fatty acid (FA) concentrations (**Table 1**) from maternal and fetal plasma and placentas were determined, as well as maternal liver. Phospholipids (PL) and neutral lipids (NL) were determined in placentas (and maternal livers) only. First, no difference was observed for FA concentrations in maternal plasma between the two groups. In placentas, NL FA concentration (NL, i.e. neutral lipids corresponding to the intracellular lipid storage) was significantly increased in exposed group compared to control (+95.1%, p=0.0002) whereas there was no difference between groups for PL FA concentration (PL, i.e. phospholipids corresponding to the cell membranes). In fetal plasma, FA concentrations were significantly increased (+25.2%, p=0.021) in exposed foetuses compared to controls.

Plasma and placental FA profiles are given in Tables 2 to 5 and were analyzed one by one.

Fatty acid profile of F1 maternal plasma

In maternal plasma (**Table 2**) palmitic acid (PA, C16:0) tended to be higher in the *in utero* exposed dams (+9.3%, p=0.067) whereas C16:1n-7 and C18:3n-3 were decreased in exposed group (-39.1%, p=0.027 and -36.7%, p=0.019, respectively), compared to controls. The PUFA, especially those from n-3 series, tended to decrease in the exposed group compared to control (-27.8%, p=0.068). The PCA confirmed these differences between the groups of F1 dams, but did not give any specific fatty acid signature related to their *in utero* exposure (**Supplemental Figure S2**).

Fatty acid profile of F2 placental membranes (PL)

"Exposed" placenta membranes (PL) (**Table 3**) were characterized by lower C15:0 and SFA (-14.4%, p=0.025 and -1.6%, p=0.024, respectively) contents, as well as lower LC n-6 PUFA (Long Chain PolyUnsaturated Fatty Acids \geq 20 carbons), especially C20:2n-6 and C22:4n-6 (-16.1%, p=0.017 and -28.4%, p=0.004) and LC n-3 PUFA, particularly docosapentaenoic acid (DPA, C22:5n-3, -8%, p=0.031) compared to controls. They were also characterized by higher MUFA (MonoUnsaturated Fatty Acids) content, especially C16:1n-9 (+21%, p=0.02) compared to controls. PCA performed on placental PL FA profiles confirmed these differences that designed altogether a specific FA signature allowing the discrimination of each group in placental membranes (**Supplemental Figure S3**), with the main plan representing 43.8% of the inertia of the data summarized in Table 3.

Fatty acid profile of F2 placental intracellular lipid storages (NL)

"Exposed" placenta intracellular lipid stores (NL) (**Table 4**) were characterized by lower C14:0 and C15:0 contents (-14.2%, p=0.004 and -12.1%, p=0.035), a tendency for lower dihomo-gamma-linolenic acid content (DGLA, C20:3n-6, -17.5%, p=0.064), as well as lower

PUFA contents (-17.3%, p=0.014), especially arachidonic acid content (AA, C20:4n-6, -31.7%, p=0.026); they were also characterized by higher MUFA (+12.7%, p=0.02), particularly oleic acid (OA, C18:1n-9, +17.5%, p=0.035), compared to control placentas. PCA were performed on placentas FA NL profiles and showed that this specific significant signature was biologically relevant since it discriminates the two groups with the main plan representing 50.7% of the inertia of the data (**Supplemental Figure S4**).

Fatty acid profile of F2 fetal plasma

"Exposed" F2 fetuses (**Table 5**) were characterized by a tendency for lower linoleic acid (LA, C18:2n-6, -18.4%, p=0.065) and MUFA (C20:1 and C22:1) contents, higher LC n-3 PUFA contents, a tendency of higher C20:2n-6 (+85.1%, p=0.059) and LC n-6 PUFA contents compared to controls. These analyses of fetal plasma were confirmed by PCA since exposed and control fetuses were discriminated by their FA specific signatures (or profils) on the corresponding PCA, representing 61.6% of the inertia of the data in the main plan (**Supplemental Figure S5**).

Exploration of Placental function through transcriptomic analyses

Preliminary candidate gene approach

First of all, preliminary gene expression study was performed with a gene candidate approach with RT-qPCR. The gene expression of *SLC38A2* and *SLC2A1* tended to be reduced in exposed placentas compared to control (-36.7%, p=0.059 and -17.4%, p=0.051, respectively, data not shown).

Transcriptomic analyses

Differential gene expression between exposed and control groups was observed for F-box protein 32 (*FBXO32*, +119%, 4 significant probes on a total of 5 probes in microarray), T-cell activation RhoGTPase activating protein (*TAGAP*, +214%, 2 significant probes on a total of 2 probes) and Interleukin 23 α subunit p19 (*IL23*, +275%, 1 significant probe on a total of 1 probe).

Because the strategy used to analyze transcriptomics is based on a single-gene expression level that becomes inefficient with subtle exposures (Weidner *et al.* 2016), we analyzed placental transcriptomic data by GSEA approach. GSEA first maps all detected unfiltered transcripts to the intended gene sets to allow the analysis of thousands of transcripts potentially involved in the concerted regulation of specific pathways.

KEGG and GO enrichment analysis using GSEA application demonstrated that a total of 58 significant enriched gene sets were observed after FDR multiple test adjustment (q-value <0.25) for the exposed group, including 10 terms for KEGG database, 14 terms for biological process (BP) category, 19 terms for cellular component (CC) category and 15 terms for molecular function (MF) category (**Supplemental Table S4, S5, S6, S7**). In the top fifteen of terms for all databases, with an enrichment score ranking, most of the terms defining the exposed group (exposed F2 placenta transcriptome) were involved in intracellular organisation (nuclear pore and envelope, "integral to organelle membrane", "organelle membrane" and "golgi vesicle transport") and in protein metabolism ("signal sequence binding", "ubiquitin protein ligase activity", "ubiquitin mediated proteolysis" and "proteasome complex") (**Figure 1**).

KEGG and GO enrichment analysis using GSEA application demonstrated that a total of 69 significant enriched gene sets were observed after FDR multiple test adjustment for the control group (i.e. down-regulation in exposed group), including 16 terms in KEGG database,

18 terms for BP category, 11 terms for CC category and 24 terms for MF category (**Supplemental Table S4, S5, S6, S7**). In the top fifteen gene sets enrichment, most of the terms were involved in olfaction transduction and neuroactive ligand or in membrane and intracellular pathways (G protein coupled receptor activity, G protein coupled receptor binding, amine receptor activity, cation channel activity, substrate specific channel activity and ion channel activity)(**Figure 1**).

Discussion

This study was designed to explore the placental function through several approaches in order to explain the F2 feto-placental phenotype previously described (Valentino *et al.* 2016). To reiterate, we exposed F0 female to DE during their gestation and we reported change in plasma biochemistry of their grandchildren, namely F2 fetuses at the end of gestation, but no change in placenta or fetal weights, contrary to F1 ones.

First, the F2 placenta structure was analyzed to explore the placental vascularization and trophoblast volume. No change was identified this way between the EC and CC F2 placentas.

Fatty acid profiles

Then FA concentration of placenta membranes were analyzed, and no statistically significant change was observed neither, confirming the stereological data. On the other hand when the placental intracellular lipid content was analyzed, we observed that it was greatly increased in the EC placentas compared to CC, as reported in placentas issued of pregnant rabbits fed a high fat diet (Picone *et al.* 2011; Tarrade *et al.* 2013). If placentas were retaining fats, it appeared essential to analyze both F1 maternal and F2 fetal plasma. As expected the FA concentrations of EC F2 plasma were increased compared to CC, confirming the plasma biochemical analyses showing higher plasma triglycerides in these fetuses (Valentino *et al.* 2016). On the other hand the plasma FA concentration was similar whatever the F1 pregnant

dam group, which was coherent since the F1 female rabbits were receiving a similar diet. However because these E F1 rabbits were exposed in utero to DE, we were expecting an impact on their phenotype at adulthood, which was not obvious as they were pregnant. It is known that the gestational status disrupts maternal metabolism with an intense increase in plasma non esterified FA (NEFA) that was shown to occur physiologically near-term in control rats (Cerf & Herrera 2016); this is known to reflect an index of adipose tissue lipolysis; these NEFA are retrieved by the liver where they are re-esterified to produce triglycerides released back into the circulation (Amusquivar & Herrera 2003). The gestational state is associated with many complex metabolic alterations in order to meet not only the energetic demands of the developing fetus but also ensure deposition of adequate energy substrate stores to contribute to neonatal nutritional requirements following birth, such as lactation (Lindsay et al. 2015). Indeed histological analyses of maternal livers highlighted hepatic steatosis in pregnant rabbit whatever their groups but this histological approach did not allow any quantification (Supplemental Figure S6). However, the classical lipid analyses allowed this quantification and showed that hepatic intracellular lipid were higher in E F1 females compared to controls. We hypothesized that we may have missed an increase in plasma NEFA in E F1 females since both F2 placental lipid storage and fetal plasma presented high FA concentrations. The absence of any increase in plasma NEFA is unexpected in the catabolic phase of later pregnancy and may reflect enhanced placental fatty acid uptake and utilization for fetal tissue growth (Lindsay et al. 2015). In this study, the placenta functioned as a nutrient sensor to achieve a proper fetal growth and maybe prevent further pathological outcomes. We went further by focusing our attention on the particular fatty acid profiles of these tissues. It is well-known that both dietary intake and metabolic turnover of fatty acids has a significant effect on blood and tissue FA content with major impact on health. A sufficient and adequate fatty acid intake is very important in every stage

of life, but particularly for the fetus during pregnancy and the neonatal period to enable normal fetal growth. Despite a similar dietary intake to controls, plasmas from E F1 female were enriched in C16:0 and mainly depleted in C16:1 and ALA. The increase in C16:0, parallel to C14:0 decreased, suggested a higher de novo lipogenesis (Lee *et al.* 2015), probably using ALA as substrate (Burdge & Wootton 2003).

Fatty acids to be transferred from mother to fetus, namely AA, EPA and DHA, accumulate preferentially into placental phospholipid fraction, stimulating cellular fatty acid uptake, prior to be transferred (Johnsen et al. 2009). In E placental PL fraction, we observed a weak decreased of non biologically active intermediates of the n-6 PUFA series (GLA, C20:2n-6 and C22:4n-6), a slight decrease in SFA while MUFA (C16:1) increased, leading to a small increase in PUFA/SFA ratio, traducing an increase in membrane fluidity leading to a higher transfer of fatty acids across the placenta. In parallel C18:1, which leads to lipid droplets formation inside the placenta (Tobin et al. 2009), was effectively more accumulated into NL fraction whatever the considered placenta. In E placental NL fraction, in which FA concentration nearly doubled compared to controls, every content in n-6 (C22:4n-6) and n-3 LCPUFA (DPA and DHA) increased, while AA percentage was halved, enough to meet the needs of the fetus, but reduced to limit the inflammatory processes in the placenta. Indeed most of the prostaglandins and related compounds, known as eicosanoids, are derived from arachidonic acid. These AA-derived eicosanoids have various roles among those in inflammation, immune system modulation, and tissue growth. For this goal, the major source of AA is through its release from cellular stores. Within the cell, it resides predominantly at the C-2 position of membrane phospholipids and is released from there upon the activation of phospholipase A2 (Benassayag et al. 1997). The eicosanoids are considered as local hormones, with specific effects on target cells close to their site of formation. In addition to participating in intercellular signaling, there is evidence for involvement of eicosanoids in
intracellular signal cascades. Additional biologically significant eicosanoids are derived from dihomo-gamma-linolenic acid (DGLA) which is produced in the reaction pathway leading to AA from LA, with distinctly different biological actions (anti-inflammatory, vasodilation, and they inhibition of platelet aggregation).

Finally F2 blood lipid composition does reflect fetuses' health status, with decreased circulating lipoproteins providing information on their atherogenicity to blood vessels and circulating plasma fatty acids, such as n-6/n-3 PUFA ratio, giving indication on proinflammatory status of blood vessels. Indeed the increase in the ratio of n-6/n-3 PUFA coincides with high incidence of chronic inflammatory diseases such as nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), cardiovascular disease or obesity (Patterson et al. 2012). The decreased n-6/n-3 fatty acid ratio was shown to reduce atherosclerotic lesions in apoE-/- mice most probably through the antiinflammatory properties of n-3 fatty acids and not only their lipid-lowering effect (Wan et al. 2010). The increasing replacement of SFA by n-3 PUFA in plasma may explain the lowering total and LDL cholesterol levels, as observed in the literature in mice a context of atherosclerosis and dietary n-3 PUFA intake (Chang & Deckelbaum 2013). Nevertheless the plasma FA concentration was higher in E fetuses compared to controls but with lower proportion of AA, to avoid a pro-inflammatory imbalance. On the other hand, the placental FA transfer induced set reserves in n-3 PUFA, among those biologically active PUFA. Thus anti-inflammatory eicosanoids are derived from EPA, which is itself derived from ALA. Changes in FA profiles from the mother to her fetuses across the placental fractions seemed to sign an adaptive reaction to the in utero exposure of their mothers, involving the n-3 PUFA as plasma markers.

Differential gene expression

The classical analysis of placental transcriptomics just showed a differential gene expression for a few number of genes, among which *Interleukin 23 subunit alpha (IL-23A)*. *IL23A* gene

is expressed in trophoblastic cells in placenta, and its over expression was reported in the context of menstrual cycle and early pregnancy (Cai & Li 2016), with an implication in miscarriage (Saifi *et al.* 2014). *IL-23* takes an important place in the inflammatory response against infection, by promoting up-regulation of the matrix metalloprotease MMP9, increasing angiogenesis and reducing CD8⁺ T-cell infiltration. Its over-expression suggests an adaptive response to a rising risk of infection. Indeed a lack of IL-12/IL-23p40 in preterm neonates appears to play a critical role in their higher susceptibility to infections (Lavoie *et al.* 2010). The T-cell activation Rho GTPase-activating protein (TAGAP) gene was also over-expressed in placenta, even if this has never been described before. TAGAP has been described to exert a regulatory role in T cell activation in Crohn's disease (Connelly *et al.* 2014); thus TAGAP stimulates a GTPase that inactives Rho, leading to impaired T cell activation.

F-Box Protein 32 gene (FBXO32) encodes a member of the F-box protein family. The F-box proteins constitute one of the four subunits of the ubiquitin protein ligase complex, which function is central for the selection of proteins targeted for degradation by the ubiquitin proteasome pathway. This gene was over-expressed in F2 placenta from the exposed group. Such over-expression has been reported in trophoblasts cultured in hypoxia or 75% nutrient-restricted media (Jones & Brannon 2013). Expression of atrogin-1 (FBOX32), a major E3 ligase in muscle, was increased following food deprivation, implemented in degradation of muscle protein during starvation in Atlantic salmon (Tacchi *et al.* 2010).

Contribution of GSEA analysis

After using differential single-gene expression approaches, GSEA appears complementary and provides a framework with which to observe changes operating at a higher level of biological processes (Subramanian *et al.* 2005). In addition, from the perspective of individual genes, only 3 genes were differentially expressed between EC and CC, whereas from the

perspective of gene sets, 58 genes sets were enriched in EC placentas and 69 in CC placentas (i.e. down-regulated functions in EC).

In EC placentas, «Proteasome complex», «Ubiquitin protein ligase activity» and « Ubiquitin mediated proteolysis » gene sets were enriched. The proteasome is a proteindestroying apparatus involved in many essential cellular functions, such as regulation of cell cycle, cell differentiation, signal transduction pathways and apoptosis. It is capable of degrading a variety of cellular proteins in a rapid and timely way and most substrate proteins are modified by ubiquitin before their degradation by the protéasome (Livneh et al. 2016). Genes encoding protein degradation machinery were slightly over-expressed in EC placentas, among those FBXO32 gene involved in formation of proteasome, suggesting an increase in protein degradation following either an increase in protein production or an increase in malformed and misfolded proteins. In intrauterine growth retardation, ubiquitination of amino acid transporter SNAT2 was increased (Chen et al. 2015), leading to decreased SNAT2 protein expression and decreased placental amino acid transport. In our study, we did not observe any sign of growth retardation, probably because of a small control sample size. Despite no sign of fetal hypotrophy, EC placentas presented nevertheless a trend for a decreased SLC38A2 expression, encoding for the System A amino acid transporter (SNAT2), which gene expression is up-regulated at the transcriptional level in response to amino acid deprivation (Palii et al. 2004). Moreover over-expression of proteasome complex component could induce premature birth (Luo et al. 2015) or preeclampsia (Kang et al. 2011). The « RNA degradation » gene set was also enriched in EC placentas and it is composed of genes coding for proteins involved in CCR4-NOT complex that regulates the mRNA synthesis and degradation. Other genes coded for proteins, which are components of exosome, which function is to degrade RNA in nucleus and cytosol. This over-expression of RNA degradation machinery was associated with the enrichment of « nuclear pore » and « nuclear envelope »

gene sets with genes involved in transport of RNA through the nuclear membrane and the enrichment of «organelle membrane», «integral to organelle membrane» and «Golgi vesicle transport » with genes involved in protein transport between the different organelles in the cell. All these observations indicate an increase in cellular protein and RNA trafficking. Placental-derived exosome cargo is proteins, messenger RNA, miRNA and fatty acids (Mitchell et al. 2015). Placental exosome could be assembled and released in response to neighboring cells and tissues or in response to local environment (e.g., oxygen tension, glucose and free fatty acids concentration) (Mitchell et al. 2015). Plasmatic exosome concentration increases with the pregnancy (Sabapatha et al. 2006). An over-expression of the exosome components could reflect a disturbed placental function and its metabolic status, confirmed with disturbed placental fatty acid profiles (Mitchell et al. 2015). The « Cation/Ion channel activity » gene sets were down-regulated in EC placentas. In "Ion channel activity", the PKD2 gene is a non-specific cation channel with high affinity for calcium and its downregulation could affect placental vascularization and promote protein production (Allen et al. 2006). These observations could reflect slight vascularization defaults, implicated in preeclampsia (Phipps et al. 2016), which is not observable with stereological approach but that may be analyzed with 3D power Doppler. Moreover, « Systemic lupus erythematosus », « Allograft rejection », « Graft versus hist disease » and « Autoimmune thyroid disease » gene sets were down-regulated in EC placentas. These gene sets are composed of genes coding for proteins involved in pro-inflammatory response and immune reactions with lymphocytes activation as well as TNF, IL10, IL1A. If IL23 and TAGAP do not belong to these gene sets, to our knowledge, the overall function contributing to down regulate inflammation in placenta is consistent between these results. Adaptive changes occur within the placenta involving changes in the expression of genes primarily probably involved in oxidative stress, inflammation, immunity, such as what happens in human smoking during the pregnancy

(Votavova *et al.* 2011), in whose placenta, it has been associated with an increased expression of antioxidant enzymes (Sidle *et al.* 2007), in order to facilitate trophoblast invasion of the spiral arteries and reduce adverse effects due to oxidative damage. These observations could confirm the placental adaptations observed with fatty acid profiles, which suggest protection of the fetus against inflammatory processes. Even if no clear link can be defined to connect the fatty acid phenotype to the molecular one, this bundle of results contributes to present a rather protective adaptation of the placenta promoting a fetal growth adequately preserved in F2 fetuses. However, we should not forget the fact that these fetuses were presenting hypertriglyceridemia, even if they are rich in n-3 PUFA.

Conclusion

In conclusion, *in utero* exposure of F1 females to DE can affect placental function and fetal metabolism in their F2 offspring. Fatty acid profiles and concentrations of placental fractions suggest adaptive protective mechanisms against inflammation, through the placental storage of non essential fatty acids such as MUFA, and the favored transplacental transfer of n-3 PUFA, known for their lipid-lowering effect and anti-inflammatory role. Adaptive regulation through inflammation is consistent with the molecular changes observed thanks to the GSEA analysis of transcriptomic placental data, showing a downregulation of inflammations gene sets, coherent with the up-regulation of gene sets involved in protein metabolism (proteasome) and intracellular signaling. It is not possible to decipher if these effects result from altered in utero development of maternal F1 gametes, or if they result of the adult F1 phenotype, not as dramatic but however altered. This study explores the transmission of intergenerational effect via the female way only, similar investigations should be made through the male way as well.

Atmospheric pollution should be taken into account, as well as maternal nutrition, stress or pharmaceutical treatment, as a disruptor on offspring's phenotype establishment at adulthood

with high risk of intergenerational transmission. Exposure to diesel engine exhaust induced intergenerational effects, but the mechanisms involved in this transmission should be further explored for example through the analyze of epigenetic marks in the first and second generations.

Tissue	Effective		Median	Fully adjusted linear model				
	С	Е	С	Е	β value	CI	p-value	
Maternal F1 plasma (µg/mL)	3	9	396.4 [325.4; 463.6]	390.2 [359.5; 454.0]	7.03	[-98.21;112.26]	0.901	
Maternal F1 liver (NL) (mg/g of liver)	3	9	44.7 [41.1; 65.4]	107.6 [89.9; 125.5]	56.37	[16.12;96.61]	0.050*	
F2 Placenta (NL) (mg/g of placenta)	11	11	1.7 [1.5; 1.9]	3.4 [2.8; 4.2]	1.74	[1.26;2.22]	0.0002***	
F2 Placenta (PL) (mg/g of placenta)	12	12	3.3 [2.9; 3.7]	5.4 [3.4; 6.4]	2.03	[-0.16;4.22]	0.109	
F2 Fetus plasma (µg/mL)	12	8	385.4 [346.7; 407.9]	482.7 [460.9; 577.8]	113.84	[41.58;186.09]	0.021*	

Table 1 | Fatty acid (FA) concentrations in F1 adult plasma and hepatic intracellular lipid storage, F2 placentas and F2 fetal plasma at 28dpc

Data are expressed as Median[Q1;Q3]. CI: Confidence Interval; NL: neutral lipids for intracellular lipid storage; PL: phospholipids for cell membranes.

Variable	Number of dams		Median [Q	Fully adjusted linear model			
	С	Е	С	E	β value	CI	p-value
C16:0 (PA)	3	9	29.1 [28.5; 30.1]	31.8 [30.4; 32.8]	2.55	[0.53;4.57]	0.067
C16:1n-7	3	9	10.4 [8.2; 11.5]	6.4 [6.1; 8.2]	-3.15	[-4.98;-1.31]	0.027*
Total C16:1	3	9	10.9 [8.6; 11.9]	7.1 [6.6; 8.6]	-3.10	[-4.91;-1.28]	0.028*
C18:0 (SA)	3	9	8.0 [6.0; 9.2]	10.0 [8.7; 12.7]	3.73	[-0.90;8.36]	0.186
Total C18:1	3	9	25.2 [25.0; 28.8]	25.4 [24.2; 29.5]	-1.03	[-8.21;6.15]	0.791
C18:2 n-6 (LA)	3	9	17.7 [16.9; 17.9]	16.2 [15.4; 17.3]	-1.25	[-2.44;-0.06]	0.106
C18:3 n-3 (ALA)	3	9	2.8 [2.5; 3.3]	1.78 [1.56; 2.02]	-1.22	[-1.85;-0.59]	0.019*
C20:4 n-6 (AA)	3	9	1.5 [0.9; 1.6]	1.0 [0.8; 1.7]	-0.06	[-0.84;0.72]	0.892
C20:5 n-3 (EPA)	3	9	0.02 [0.00; 0.04]	0.04 [0.02; 0.37]	0.18	[-0.34;0.71]	0.529
C22:4 n-6	3	9	0.04 [0.04; 0.11]	0.04 [0.03; 0.06]	-0.01	[-0.08;0.06]	0.794
C22:5 n-6	3	9	0.08 [0.00;0.08]	0.06 [0.05; 0.11]	0.04	[-0.05;0.14]	0.397
C22:5 n-3 (DPA)	3	9	0.07 [0.05; 0.08]	0.05 [0.02; 0.08]	-0.01	[-0.07;0.05]	0.710
C22:6 n-3 (DHA)	3	9	0.05 [0.04; 0.07]	0.04 [0.03; 0.06]	-0.01	[-0.05;0.03]	0.608
Total SFA	3	9	39.9 [38.7; 40.0]	44.9 [41.5; 47.5]	6.37	[-0.98;13.71]	0.162
Total MUFA	3	9	37.8 [36.7; 37.9]	34.6 [31.4; 37.3]	-4.04	[-10.34;2.25]	0.272
Total n-6 PUFA	3	9	19.7 [19.4; 20.1]	18.9 [17.6; 19.3]	-1.16	[-3.05;0.72]	0.289
Total n-3 PUFA	3	9	3.2 [2.9; 3.7]	2.3 [2.1; 2.8]	-1.11	[-2.01;-0.22]	0.068
n-6/n-3 PUFA ratio	3	9	6.4 [5.3; 6.8]	8.2 [6.6; 9.5]	2.64	[-0.59;5.88]	0.181
PUFA/SFA ratio	3	9	0.58 [0.56; 0.60]	0.50 [0.42; 0.52]	-0.11	[-0.19;-0.03]	0.049*
DNL marker	3	9	1.7 [1.6; 1.7]	1.9 [1.8; 2.1]	0.30	[0.06;0.53]	0.070

Table 2 | Profile in fatty acid (FA) in plasma of C- and E- F1 adult dams at 28dpc (% of total FA).

Data are expressed as Median[Q1;Q3], in % of total FA. AA: C20:4n-6, arachidonic acid; ALA: C18:3n-3, alpha-linolenic acid; CI: Confidence Interval; DHA: C22:6n-3, docosahexaenoic acid; DNL marker: de novo lipogenesis (C16:0/C18:2n-6 ratio); DPA: C22:5n-3, docosapentaenoic acid; EPA: C20:5n-3, Eicosapentaenoic acid ; LA: C18:2n-6, linoleic acid; MUFA: monounsaturated fatty acids; PA: C16:0, palmitic acid; PL: phospholipids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; SA: C18:0, stearic acid; SFA: saturated fatty acids.

Variable	Number of placenta		Median [Q1; Q3]		Fully adjusted linear model		
	С	Е	С	Ε	β value	CI	p-value
C15:0	12	12	0.52 [0.51; 0.56]	0.45 [0.42; 0.49]	-0.09	[-0.148;-0.027]	0.025*
C16:0 (PA)	12	12	29.3 [28.9; 30.0]	29.1 [28.9; 29.4]	-0.50	[-1.514;0.51]	0.359
C16:1n-9	12	12	4.0 [3.6; 4.6]	4.9 [4.5; 5.0]	0.68	[0.234;1.131]	0.020*
Total C16:1	12	12	6.1 [5.5; 6.7]	7.0 [6.7; 7.2]	0.83	[0.35;1.307]	0.011*
C18:0 (SA)	12	12	17.3 [17.0; 17.6]	17.0 [16.5; 17.3]	-0.32	[-0.728;0.083]	0.160
Total C18:1	12	12	19.3 [18.9; 19.7]	19.4 [18.8; 20.2]	0.38	[-0.663;1.414]	0.497
C18:2 n-6 (LA)	12	12	11.8 [10.9; 12.1]	12.4 [11.8; 13.0]	0.63	[-0.051;1.304]	0.110
C18:3n-6 (GLA)	12	12	0.58 [0.50; 0.69]	0.79 [0.75; 0.87]	0.20	[0.065;0.328]	0.021*
C18:3n-3 (ALA)	12	12	0.09 [0.07; 0.09]	0.08 [0.07; 0.08]	-0.01	[-0.016;0.002]	0.190
C20:2n-6	12	12	0.16 [0.14; 0.17]	0.13 [0.12; 0.14]	-0.03	[-0.048;-0.011]	0.017*
C20:4n-6 (AA)	12	12	2.9 [2.8; 3.1]	2.5 [2.4; 2.9]	-0.19	[-0.444;0.062]	0.186
C20:5n-3 (EPA)	12	12	0.04 [0.03; 0.05]	0.04 [0.04; 0.04]	0.002	[-0.009;0.012]	0.765
C22:4n-6	12	12	0.74 [0.67; 0.85]	0.53 [0.49; 0.62]	-0.21	[-0.313;-0.112]	0.004**
C22:5n-6	12	12	0.86 [0.80; 1.02]	0.70 [0.63; 0.90]	-0.17	[-0.417;0.069]	0.200
C22:5n-3 (DPA)	12	12	0.69 [0.65; 0.78]	0.64 [0.50; 0.65]	-0.13	[-0.233;-0.035]	0.031*
C22:6n-3 (DHA)	12	12	0.26 [0.22; 0.27]	0.27 [0.22; 0.32]	0.01	[-0.054;0.078]	0.732
Total SFA	12	12	49.3 [48.8; 49.8]	48.5 [47.8; 49.0]	-0.77	[-1.308;-0.241]	0.024*
Total MUFA	12	12	27.3 [26.2; 27.7]	28.2 [27.5; 29.3]	1.33	[0.165;2.491]	0.058
Total n-6 PUFA	12	12	22.2 [27.8; 23.0]	22.1 [21.3; 23.1]	-0.64	[-1.814;0.541]	0.320
Total n-3 PUFA	12	12	1.2 [1.1; 1.2]	1.1 [0.9; 1.2]	-0.13	[-0.279;0.019]	0.127
n-6/n-3 PUFA ratio	12	12	19.2 [18.1; 19.7]	19.1 [18.6; 24.2]	1.88	[-1.714;5.464]	0.335
PUFA/SFA ratio	12	12	0.47 [0.46; 0.49]	0.48 [0.47; 0.49]	-0.004	[-0.02;0.012]	0.653

Table 3 | Profile in fatty acid (FA) in PL of C- and E- F1 placenta at 28dpc (% of total FA).

Data are expressed as Median[Q1;Q3], in % of total FA. AA: C20:4n-6, arachidonic acid; ALA: C18:3n-3, alpha-linolenic acid; CI: Confidence Interval; DHA: C22:6n-3, docosahexaenoic acid; DPA: C22:5n-3, docosapentaenoic acid; EPA: C20:5n-3, Eicosapentaenoic acid; GLA: C18:3n-6, gamma-linolenic acid; LA: C18:2n-6, linoleic acid; MUFA: monounsaturated fatty acids; PA: C16:0, palmitic acid; PL: phospholipids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; SA: C18:0, stearic acid; SFA: saturated fatty acids.

Variable	Number of placenta		Median [Q1; Q3]			Fully adjusted linear model		
	С	Е	С	Е	β value	CI	p-value	
C14:0	11	11	2.2 [2.1; 2.4]	1.9 [1.8; 1.9]	-0.35	[-0.51;-0.19]	0.004**	
C15:0	11	11	0.91 [0.84; 0.94]	0.80 [0.69; 0.85]	-0.11	[-0.19;-0.03]	0.035*	
C16:0 (PA)	11	11	33.3 [32.4; 34.5]	34.0 [32.0; 34.8]	0.36	[-1.51;2.23]	0.715	
Total C16:1	11	11	7.5 [7.0; 7.8]	7.8 [7.4; 8.0]	0.81	[-0.48;2.10]	0.253	
C18:0 (SA)	11	11	9.6 [9.2; 10.1]	9.1 [8.7; 9.9]	-0.38	[-0.99;0.23]	0.253	
C18:1n-7	11	11	3.1 [3.0; 3.3]	3.2 [3.2; 3.4]	0.27	[0.06;0.48]	0.043*	
C18:1n-9	11	11	22.6 [22.4; 24.7]	26.6 [24.1; 27.4]	3.06	[0.74;5.37]	0.035*	
Total C18:1	11	11	25.8 [25.4; 27.7]	29.8 [27.4; 30.8]	3.18	[1.01;5.35]	0.023*	
C18:2n-6 (LA)	11	11	8.9 [8.6; 9.5]	7.9 [6.7; 8.5]	-1.62	[-2.76;-0.48]	0.026*	
C18:3n-3 (ALA)	11	11	0.49 [0.46; 0.51]	0.43 [0.36; 0.47]	-0.07	[-0.14;-0.01]	0.057	
C20:3n-6 (DGLA)	11	11	5.0 [4.1; 6.3]	4.1 [3.7; 4.6]	-1.04	[-1.97;-0.10]	0.064	
C20:4n-6 (AA)	11	11	1.6 [1.4; 1.7]	1.1 [1.0; 1.3]	-0.27	[-0.46;-0.09]	0.026*	
C20:5n-3 (EPA)	11	11	0.09 [0.08; 0.10]	0.07 [0.06; 0.08]	-0.02	[-0.04;-0.01]	0.008**	
C22:2n-6	11	11	0.17 [0.14; 0.21]	0.13 [0.09; 0.14]	-0.05	[-0.09;-0.01]	0.047*	
C22:4n-6	11	11	0.54 [0.38; 0.65]	0.28 [0.26; 0.42]	-0.09	[-0.21;0.03]	0.168	
C22:5n-6	11	11	0.17 [0.14; 0.21]	0.12 [0.11; 0.18]	-0.04	[-0.09;0.02]	0.256	
C22:5n-3 (DPA)	11	11	0.22 [0.18; 0.24]	0.16 [0.12; 0.23]	0.01	[-0.04;0.07]	0.643	
C22:6n-3 (DHA)	11	11	0.04 [0.03; 0.09]	0.04 [0.03; 0.05]	-0.03	[-0.06;0.002]	0.104	
Total SFA	11	11	46.3 [44.8; 47.6]	45.5 [43.7; 47.0]	-0.03	[-2.48;2.41]	0.978	
Total MUFA	11	11	33.9 [33.3; 35.9]	38.16 [36.0; 38.9]	4.02	[1.35;6.68]	0.02*	
Total n-6 PUFA	11	11	18.0 [16.4; 19.4]	14.8 [14.4; 16.2]	-3.48	[-5.55;-1.41]	0.013*	
Total n-3 PUFA	11	11	1.8 [1.3; 1.9]	1.7 [1.5; 1.8]	-0.02	[-0.22;0.18]	0.876	
n-6/n-3 PUFA ratio	11	11	10.5 [9.5; 13.6]	9.0 [8.3; 10.0]	-2.07	[-4.12;-0.03]	0.085	
PUFA/SFA ratio	11	11	0.45 [0.38; 0.46]	0.35 [0.33: 0.41]	-0.07	[-0.13:-0.02]	0.039*	

Table 4 | Profile in fatty acid (FA) in placenta NL of C- and E- F1 at 28dpc (% of total FA).

Data are expressed as Median[Q1;Q3], in % of total FA. AA: C20:4n-6, arachidonic acid; ALA: C18:3n-3, alpha-linolenic acid; CI: Confidence Interval; DHA: C22:6n-3, docosahexaenoic acid; DPA: C22:5n-3, docosapentaenoic acid; EPA: C20:5n-3, Eicosapentaenoic acid ; LA: C18:2n-6, linoleic acid; MUFA: monounsaturated fatty acids; PA: C16:0, palmitic acid; PL: phospholipids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; SA: C18:0, stearic acid; SFA: saturated fatty acids

Variable	Number of fetus		Median [Q1; Q3]		Fully adjusted linear model		
	С	Е	С	E	β value	CI	p-value
C15:1n-9	12	8	0.16 [0.12; 0.22]	0.28 [0.21; 0.29]	0.10	[0.04;0.16]	0.019*
C16:0 (PA)	12	8	39.4 [37.7; 40.3]	35.1 [31.5; 37.7]	-4.36	[-7.18;-1.55]	0.022*
Total C16:1	12	8	6.3 [6.0; 6.9]	6.0 [5.3; 6.5]	-0.27	[-1.15;0.60]	0.558
C18:0 (SA)	12	8	11.5 [11.2; 11.9]	10.7 [10.3; 11.3]	-0.44	[-2.20;1.32]	0.637
C18:1n-7	12	8	2.0 [1.8; 2.1]	1.5 [1.3; 1.6]	-0.39	[-0.62;-0.17]	0.013*
Total C18:1	12	8	22.6 [21.1; 23.1]	18.5 [17.7; 22.5]	-1.64	[-4.83;1.54]	0.346
C20:0	12	8	0.13 [0.11; 0.15]	0.80 [0.42; 1.15]	0.58	[0.18;0.98]	0.029*
C20:1n-9	12	8	0.38 [0.32; 0.46]	1.33 [0.95; 2.03]	1.02	[0.59;1.44]	0.003**
C20:1n-7	12	8	0.07 [0.05; 0.08]	0.475 [0.28; 0.70]	0.40	[0.23;0.57]	0.003**
Total C20:1	12	8	0.46 [0.39; 0.53]	1.80 [1.23; 2.73]	1.42	[0.83;2.00]	0.003**
C18:2 n-6 (LA)	12	8	11.1 [10.5; 12.1]	9.1 [8.6; 9.9]	-1.70	[-3.19;-0.21]	0.065
C18:3 n-3 (ALA)	12	8	0.57 [0.44; 0.67]	0.57 [0.49; 0.57]	-0.06	[-0.27;0.15]	0.582
C18:4n-3	12	8	0.18 [0.15; 0.28]	0.32 [0.24; 0.51]	0.16	[0.07;0.25]	0.013*
C20:2n-6	12	8	0.34 [0.29; 0.39]	0.62 [0.21; 0.93]	0.29	[0.04;0.53]	0.059
C20:3n-6	12	8	0.49 [0.45; 0.57]	0.36 [0.30; 0.42]	-0.13	[-0.20;-0.06]	0.012*
C20:4 n-6 (AA)	12	8	2.6 [2.5; 2.8]	1.59 [1.34; 1.83]	-1.03	[-1.37;-0.69]	0.001**
C20:4n-3	12	8	0.09 [0.06; 0.15]	0.190 [0.10; 0.26]	0.13	[0.04;0.22]	0.032*
C20:5 n-3 (EPA)	12	8	1.4 [0.01; 1.7]	1.5 [0.05; 2.6]	0.02	[-0.97;1.01]	0.973
C22:0	12	8	0.09 [0.07; 0.10]	1.48 [0.71; 2.00]	1.31	[0.79;1.83]	0.003**
C22:1n-9	12	8	0.05 [0.04; 0.12]	0.39 [0.35; 0.68]	0.45	[0.24;0.66]	0.006**
C22:4 n-6	12	8	0.12 [0.05; 0.16]	1.85 [0.72; 4.22]	2.12	[1.23;3.01]	0.003**
C22:5 n-6	12	8	0.20 [0.16; 0.25]	1.03 [0.35; 2.64]	1.05	[0.18;1.91]	0.054
C22:5 n-3 (DPA)	12	8	0.06 [0.04; 0.14]	2.02 [0.80; 3.99]	2.18	[1.39;2.96]	0.002**
C22:6 n-3 (DHA)	12	8	0.18 [0.16; 0.21]	0.24 [0.15; 0.61]	0.15	[0.02;0.27]	0.055
Total SFA	12	8	52.8 [51.3; 54.1]	50.2 [47.1; 52.5]	-2.11	[-4.89;0.67]	0.184
Total MUFA	12	8	29.6 [28.1; 30.9]	27.8 [26.2; 31.2]	-0.22	[-3.42;2.99]	0.898
Total n-6 PUFA	12	8	15.7 [15.0; 17.0]	16.3 [13.8; 17.7]	0.49	[-1.25;2.23]	0.599
Total n-3 PUFA	12	8	1.8 [1.1; 2.8]	4.3 [1.8; 7.5]	2.53	[0.47;4.58]	0.051
n-6/n-3 PUFA ratio	12	8	9.4 [5.6; 15.1]	3.8 [2.5; 7.6]	-7.68	[-10.84;-4.52]	0.005**
PUFA/SFA ratio	12	8	0.33 [0.31; 0.36]	0.41 [0.30; 0.56]	0.09	[0.004;0.17]	0.084

Table 5 | Profile in fatty acid (FA) in plasma of C- and E- F2 fetuses at 28dpc (% of total FA).

Data are expressed as Median[Q1;Q3], in % of total FA. AA: C20:4n-6, arachidonic acid; ALA: C18:3n-3, alpha-linolenic acid; DHA: C22:6n-3, docosahexaenoic acid; DPA: C22:5n-3, docosapentaenoic acid; EPA: C20:5n-3, Eicosapentaenoic acid ; LA: C18:2n-6, linoleic acid; MUFA: monounsaturated fatty acids; PA: C16:0, palmitic acid; PL: phospholipids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; SA: C18:0, stearic acid; SFA: saturated fatty acids.





(a) GSEA-enrichment plot of the most negatively enriched gene set: Olfactory transduction. (b) GSEA-enrichment plot of the most positively enriched gene set: Signal sequence binding. (c) Bar plot depicting the normalized enrichment score of the top 15 most negatively enriched gene sets, which contains several databases C2CP:KEGG (Orange), C5:BP (Green), C5:CC (Blue) and C5:MF (Red).
(d) Bar plot depicting the normalized enrichment score of the top 15 most positively enriched gene sets, which contains several databases C2CP:KEGG (Orange), C5:BP (Green), C5:CC (Blue) and C5:MF (Red).



Figure S1 | Stereological examination of placenta at 28 dpc.

At 28dpc, immunodetection of vimentin to label fetal capillaries was performed on labyrinthine area sections from the control group (**a**) and the exposed group (**b**). Black immunostaining represents fetal vessels (FV), blue cells are trophoblasts cells (T) and the white spaces with erythrocytes are maternal space (MS).



Figure S2 | Principal Component Analyses (PCA) of the fatty acid profile of plasma of F1 pregnant female rabbit at 28dpc.

The PCA, plotting individual factor scores, provides a representation in a space of reduced dimensions, thus providing data structure and highlighting groups of homogeneous individuals. For this, we have looked for subareas in which projection of the cloud deforms as little as possible the initial data summarized in Table 2: Fatty acid profiles of F1 maternal plasma (with FA expressed as % of total FA). The first principal axis is the one that maximizes the variance when data are projected onto a line and the second one is orthogonal to it, and still maximizes the remaining variance. The variables, here the fatty acids of the plasma profile, are plotted into a socalled Variables factor map (or "correlation circle" of the PCA, A), where the angle formed by any two variables represented as vectors, reflects their actual pairwise correlation. The Variables factor map allows identifying the variables that contribute "positively" vs. "negatively" to the PCA axes. The main plan, designed by the dimensions 1 and 2, represents 53.7% of the inertia of the data table, summarized in Table 2. The individual factor map (B) of this PCA shows that, as illustrated by the confidence ellipses drawn around the individuals, no specific FA signature characterized each group according to their in utero exposure, exposed (black) or control (red), since the dimension 1 does not correlate with the *in utero* treatment of the F1 female (v.test < 2). The main contribution of FA to dimension 1 concern a positive correlation (only the correlations >0.80 are reported here) with C22:5n-6 (0.91, p=4.4e-05), SFA (0.89, p=9.88e-05), C16:0 (0.83, p=8.38e-04), n-6/n-3 ratio (0.81, p=1.57e-03) and C18:0 (0.80, p=1.63e-03), and a negative correlation with MUFA (-0.96, p=1.32e-06). The main contribution of FA to dimension 2 concern a positive correlation with n-6 PUFA (0.0.90, p=5.31e-05), C15:0 (0.89, p=1.09e-04), C22:6n-3 (0.79, p=1.97e-03) and a negative correlation with C20:5n-3 (-0.63, p=2.82e-02). Using the v.test from FactomineR, the statistical outputs performed on this PCA (Chi2) show nevertheless that the FA profile of plasma of the F1 Exposed female rabbits is significantly different of the control one (p=0.034), and that these differences are attributed to a positive association with C16:0 (v.test=2.057, p=0.039), and a negative association with C16:1n-7 (v.test=-2.426, p=0.015), C22:1n-9 (v.test=-2.502, p=0.012) and C18:3n-3 (v.test=-2.738, p=0.006), which confirm the statistical results obtained on data Table 2.



Figure S3 | Principal Component Analyses (PCA) of the fatty acid profile of F2 placenta phospholipids (PL) at 28dpc.

The PCA, plotting individual factor scores, provides a representation in a space of reduced dimensions, thus providing data structure and highlighting groups of homogeneous individuals. For this, we have looked for subareas in which projection of the cloud deforms as little as possible the initial data summarized in Table 3: Fatty acid profiles of F2 fetal plasma (with FA expressed as % of total FA). The first principal axis is the one that maximizes the variance when data are projected onto a line and the second one is orthogonal to it, and still maximizes the remaining variance. The variables, here the fatty acids of the placenta phospholipid profile, are plotted into a so-called Variables factor map (or "correlation circle" of the PCA, A), where the angle formed by any two variables represented as vectors, reflects their actual pairwise correlation. The Variables factor map allows identifying the variables that contribute "positively" vs. "negatively" to the PCA axes. The main plan, designed by the dimensions 1 and 2, represents 43.79% of the inertia of the data table, summarized in Table 3. The individual factor map (B) of this PCA shows that, as illustrated by the confidence ellipses drawn around the individuals, a specific FA signature characterized each group according to their in utero exposure, exposed (black) or control (red), with the dimension 1 that correlates with the *in utero* treatment of the F1 female (v.test =-3.37, R2=0.49, p=0.0001). The main contribution of FA to dimension 1 concern a positive correlation (only the correlations >0.70 are reported here) with C22:4n-6 (0.91, p=9.22e-10), C22:5n-3 (0.75, p=2.83e-05), C22:2n-6 (0.72, p=8.51e-05), and a negative correlation with MUFA (-0.67, p=3.51e-04) and C14:0 (-0.61, p=1.62e-03). The main contribution of FA to dimension 2 concern a positive correlation with C22:6n-3(0.87, p=3.35e-08), C20:1n-9(0.82, p=8.54e-07), total C20:1(0.78, p=7.94e-06), total C18:1(0.67, p=3.51e-04), and a negative correlation with C20:3n-6 (-0.77, p=1.31e-05) and n-6/n-3 ratio (-0.67, p=3.12e-04). Using the v.test from FactomineR, the statistical outputs performed on this PCA (Chi2) confirm that the FA profile of placental phospholipids of the F1 Exposed female rabbits is highly significantly different of the control one with a sex interaction (TS, p=2.50e-05), and that these differences are attributed to a positive association with C18:3n-6 (v.test=3.07, p=0.0021), C16:1n-9 (v.test=2.59, p=0.0095), C18:2n-6 (v.test=2.32, p=0.0204), C14:1n-9 (v.test=2.16, p=0.0303), and a negative association with C22:4n-6 (v.test=-3.61, p=0.0003), C15:0(v.test=-3.03, p=0.0024), C22:5n-3 (v.test=-2.95, p=0.0032), C20:4n-6 (v.test=-2.76 p=0.0058), C20:2n-6 (v.test=-2.48, p=0.0131) and C22:5n-6 (v.test=-2.05, p=0.0406).



Figure S4 [Principal Component Analyses (PCA) of the fatty acid profile of F2 placenta neutral lipids (NL) at 28dpc.

The PCA, plotting individual factor scores, provides a representation in a space of reduced dimensions, thus providing data structure and highlighting groups of homogeneous individuals. For this, we have looked for subareas in which projection of the cloud deforms as little as possible the initial data summarized in Table 4: Fatty acid profiles of F2 fetal plasma (with FA expressed as % of total FA). The first principal axis is the one that maximizes the variance when data are projected onto a line and the second one is orthogonal to it, and still maximizes the remaining variance. The variables, here the fatty acids of the placenta neutral lipid profile, are plotted into a so-called Variables factor map (or "correlation circle" of the PCA, A), where the angle formed by any two variables represented as vectors, reflects their actual pairwise correlation. The Variables factor map allows identifying the variables that contribute "positively" vs. "negatively" to the PCA axes. The main plan, designed by the dimensions 1 and 2, represents 50.65% of the inertia of the data table, summarized in Table 4. The individual factor map (B) of this PCA shows that, as illustrated by the confidence ellipses drawn around the individuals, a specific FA signature characterized each group according to their in utero exposure, exposed (black) or control (red), with the dimension 1 that correlates with the *in utero* treatment of the F1 female (v.test =-3.57, R2=0.61, p=2.00e-05). The main contribution of FA to dimension 1 concern a positive correlation (only the correlations >0.80 are reported here) with C22:4n-6 (0.91 p=5.28e-09), n-6PUFA (0.90, p=1.20e-08), PUFA (0.88, p=4.58e-08), C20:4n-6 (0.88, p=5.56e-08), C14:0 (0.83, p=2.04e-06), and a negative correlation with MUFA (-0.85, p=7.13e-07), total C18:1(-0.76, p=4.04e-05). The main contribution of FA to dimension 2 concern a positive correlation with C16:1n-7(0.63, p=1.61e-03), C20:1n-7(0.61, p=2.55e-03), C18:1n-9(0.57, p=5.18e-03), and a negative correlation with SFA (-0.91, p=5.71e-09), C16:0 (-0.87, p=1.23e-07), and C18:0(-0.68, p=4.49e-04). Using the v.test from FactomineR, the statistical outputs performed on this PCA (Chi2) confirm that the FA profile of placental NL from the F1 Exposed female rabbits is highly significantly different of the control one with a sex interaction (TS, with exposed male > exposed females, p=5.52e-05), and that these differences are attributed to a positive association with C18:1n-9 (v.test=3.08, p=0.0021), C16:1n-9 (v.test=2.04, p=0.0416), and a negative association with C14:0 (v.test=-3.58, p=0.0003), C20:4n-6(v.test=-3.35, p=0.0008), C18:2n-6 (v.test=-3.12, p=0.0018), C22:4n-6 (v.test=-3.07 p=0.0021), C20:5n-3 (v.test=-2.99, p=0.0028), C15:0 (v.test=-2.75, p=0.0059), C18:3n-3 (v.test=-2.28, p=0.0222), and C20:3n-6 (v.test=-2.16, p=0.0305).



Figure S5 [Principal Component Analyses (PCA) of the fatty acid profile of plasma of F2 fetus at 28dpc.

The PCA, plotting individual factor scores, provides a representation in a space of reduced dimensions, thus providing data structure and highlighting groups of homogeneous individuals. For this, we have looked for subareas in which projection of the cloud deforms as little as possible the initial data summarized in Table 5: Fatty acid profiles of F2 fetal plasma (with FA expressed as % of total FA). The first principal axis is the one that maximizes the variance when data are projected onto a line and the second one is orthogonal to it, and still maximizes the remaining variance. The variables, here the fatty acids of the plasma profile, are plotted into a socalled Variables factor map (or "correlation circle" of the PCA, A), where the angle formed by any two variables represented as vectors, reflects their actual pairwise correlation. The Variables factor map allows identifying the variables that contribute "positively" vs. "negatively" to the PCA axes. The main plan, designed by the dimensions 1 and 2, represents 61.56% of the inertia of the data table, summarized in Table 6. The individual factor map (B) of this PCA shows that, as illustrated by the confidence ellipses drawn around the individuals, a specific FA signature characterized each group according to their in utero exposure, exposed (black) or control (red), with the dimension 1 that correlates with the *in utero* treatment of the F1 female (v.test = 3.39, R2= 060, p=5.05e-05). The main contribution of FA to dimension 1 concern a positive correlation (only the correlations >0.80 are reported here) with C20:0 (0.99 p=2.73e-19), C20:1n-7(0.99, p=5.16e-17), C20:1n-9 (0.99, p=2.30e-16), C22:5n-3(0.97, p=3.40e-03), C24:0 (0.97, p=5.95e-13), C22:4n-6:0 (0.96, p=8.72e-12), C22:5n-6 (0.95, p=9.90e-11), C28:4n-3 (0.86, p=1.18e-06), and a negative correlation with C18:1n-7 (-0.84, p=4.32e-06), C18:1n-9(-0.82, p=7.67e-06), and C20:4n-6 (-0.72, p=3.18e-04). The main contribution of FA to dimension 2 concern a positive correlation with C14:0(0.84, p=3.35e-06) and a negative correlation with C18:0 (-0.66, p=1.71e-03). Using the v.test from FactomineR, the statistical outputs performed on this PCA (Chi2) confirm that the FA profile of plasma of the F1 Exposed female rabbits is highly significantly different of the control one (p=0.006), and that these differences are attributed to a positive association with C20:1n-7 (v.test=3.65, p=0.0003), C20:1n-9 (v.test=3.52, p=0.0004), C20:0 (v.test=3.48, p=0.0005), C22:0 (v.test=3.42, p=0.0006), C22:5n-3 (v.test=3.22, p=0.0012), C22:4n-6 (v.test=3.13, p=0.0017), and C22:1n-9 (v.test=3.02, p=0.0025), and a negative association with C20:4n-6 (v.test=-3.74, p=0.0018), C18:1n-7(v.test=-3.59, p=0.0003), C20:3n-6 (v.test=-2.96, p=0.0031) and C16:0 (v.test=-2.91, p=0.0036).



Figure S6 | Histological analyses of maternal F1 liver.
Symbol	Systematic name	Trivial name
C14:0	Tetra decanoic a cid	Myristic acid
C14:1	cis-9-Tetradecenoic acid	Myristoleic acid
C15:0	Pentadecanoic acid	Penta decanoic a cid
C15:1	cis-10-Penta decenoic acid	Penta decenoic a cid
C16:0	Hexadecanoicacid	Palmitic acid
C16:1n-7	cis-9-Hexadecenoic acid	Palmitoleic acid
C18:0	Octadecanoic acid	Stearic a cid
C18:1n-9	cis-9-Octa decenoic a cid	Oleic acid
C18:1n-7	cis-11-Octa decenoic a cid	Vaccenic acid
C18:2n-6	trans,cis-10,12-Octa deca dienoic a cid	Linoleic acid (LA)
C18:3n-6	cis,cis,cis-6,9,12-Octadecatrienoic acid	Gamma-linolenic acid (GLA)
C18:3n-3	cis,cis,cis-9,12,15-Octa decatrienoic acid	Alpha-linolenic acid (ALA)
C20:0	Eicosanoic acid	Arachidic acid
C20:1n-9	cis-9-Icosenoic acid	Gadoleic acid
C20:2n-6	cis-11,14-Eicosadienoic acid	Eicosa dienoic a cid
C20:3n-6	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid	Dihomo-γ-linolenic acid (DGLA)
C20:4n-6	cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-Icosatetraenoic acid	Arachidonic acid (AA)
C20:5n-3	cis,cis,cis,cis,cis-5,8,11,14,17-Icosapentaenoic acid	Timnodonic acid (EPA)
C22:0	Docosanoic a cid	Behenic a cid
C22:1n-9	cis-13-Docosenoic acid	Erucic acid
C22:4n-6	cis,cis,cis,cis-7,10,13,16-Docosatetraenoic acid	Adrenic acid
C22:5n-6	cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16-Docosapentaenoic acid	Osbond acid
C22:5n-3	cis,cis,cis,cis,cis-4,8,12,15,19-Docosapentaenoic acid	Cuplanodonic acid (DPA)
C22:6n-3	cis,cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	Cervonic acid (DHA)
C24:0	Tetra cosanoic a cid	Lignoceric acid
C24:1n-9	cis-15-Tetra cosenoic a cid	Nervonic acid

Table S1 : Fatty acid analyzed through gas chromatography on a Econo-Cap column

Variable	Nun of d	nber ams	Median [Q1; Q3]			Fully adjusted linear mode		
	C	E	С	E	βvalue	CI	p-value	
Glycemia (mmol/L)	3	9	6.560 [6.020; 6.900]	5.630 [5.090; 7.070]	-0.274	[-2.145; 1.598]	0.786	
Insulin (mUI/L)	3	9	4.300 [4.190; 9.610]	2.430 [1.280; 4.650]	-2.606	[-7.367; 2.155]	0.339	
Total cholesterol (mmol/L)	3	9	0.200 [0.170; 0.210]	0.190 [0.165; 0.190]	-0.004	[-0.041; 0.032]	0.820	
Triglycerids (mmol/L)	3	9	0.190 [0.170; 0.220]	0.240 [0.210; 0.265]	0.157	[-0.201; 0.515]	0.434	
ASAT (UI/L)	3	8	29.00 [23.00; 29.00]	35.50 [28.50; 42.00]	8.125	[-0.363;16.61]	0.131	
ALAT (UI/L)	3	9	18.00 [15.00; 20.00]	12.00 [7.500; 18.50]	-4.778	[-11.71; 2.151]	0.244	
Creatinine (µmol/L)	3	9	84.00 [83.00; 111.0]	102.0 [81.00; 109.0]	-0.095	[-27.37;27.18]	0.995	
Urea (mmol/L)	3	9	4.900 [4.200; 5.100]	4.600 [3.650; 5.350]	0.122	[-1.627; 1.871]	0.897	

Table S2 | Maternal biochemistry at 28dpc

ASAT: Aspartate Aminotransferase; ALAT: Alanine Aminotransferase.

Variable		nber ams	Median [Q1; Q3]		Fully adjusted linear model			
	С	Е	С	Е	βvalue	CI	p-value	
Volume fraction of trophoblast	6	6	33.66 [28.45; 38.50]	35.20 [31.97; 41.71]	4.075	[-8.041;16.19]	0.542	
Volume fraction of fetal capillaries	6	6	22.01 [17.70; 25.79]	16.95 [12.78; 26.48]	-3.609	[-10.87; 3.649]	0.381	
Volume fraction of maternal blood space	6	6	38.33 [31.71; 46.27]	38.48 [33.75; 43.00]	0.105	[-8.199; 8.408]	0.981	
Surface density of trophoblast	6	6	0.252 [0.203; 0.278]	0.241 [0.179; 0.281]	-0.008	[-0.047; 0.030]	0.692	
Surface density of fetal capillaries	6	6	0.248 [0.201; 0.296]	0.220 [0.188; 0.251]	-0.027	[-0.075; 0.021]	0.328	
Surface density of maternal blood space	6	6	0.269 [0.244; 0.320]	0.245 [0.211; 0.276]	-0.047	[0.120; 0.026]	0.269	

Table S3 | Placental stereolgy at 28dpc

		Annoted	Enrichment		FDR a-
Population	Pathway	gene	Core gene	NES	value
		number	number		varue
	RNA degradation	41	22	2.07	0.015
	Ubiquitin mediated proteolysis	98	40	1.96	0.033
	Protein export	16	12	1.93	0.024
	AminoacylTRNA biosynthesis	35	20	1.86	0.035
Expand	N-Glycan biosynthesis	29	14	1.79	0.049
Exposed	Adherens Junction	62	19	1.77	0.049
	Endocytosis	125	49	1.71	0.066
	Sphingolipid metabolism	27	11	1.69	0.069
	Valine/Leucine/Isoleucine degradation	37	18	1.52	0.209
	Chronic myeloid Leukemia	59	25	1.5	0.215
	Olfactory transduction	82	56	-2.03	0.000
	Neuroactive ligand receptor interaction	181	127	-2.02	0.000
	Systemic lupus erythematosus	40	27	-1.87	0.009
	Allograft rejection	18	11	-1.78	0.023
	Autoimmune Thyroid disease	19	12	-1.75	0.029
	Graft versus hist disease	15	11	-1.73	0.030
	Intestinal immune network for IGA production	30	21	-1.67	0.059
Control	Drug metabolism other enzymes	23	8	-1.66	0.061
Control	Dilated cardiomyopathy	71	27	-1.54	0.163
	Cardiac muscle contraction	43	17	-1.53	0.170
	Calcium signaling pathway	130	58	-1.50	0.197
	Complement and coagulation cascades	52	35	-1.50	0.186
	Primary immunodeficiency	26	12	-1.49	0.180
	Hypertrophic cardiomyopathy HCM	68	26	-1.47	0.209
	Cell adhesion molecules cams	92	43	-1.43	0.254
	Adipocytokine signaling pathway	58	21	-1.43	0.247

Table S4 Gene s	set Enrichment	Analysis –	Database	C2:KEGG
-------------------	----------------	------------	----------	---------

		Annoted	Enrichment		FDD a
Population	Pathway	gene	Core gene	NES	rDK q- value
		number	number		value
	Golgi vesicle transport	33	16	2.22	0.012
	Phosphoinositide metabolic process	21	9	1.93	0.103
	Intracellulartransport	210	54	1.89	0.094
	Endosome transport	18	7	1.87	0.085
	Ubiquitin cycle	31	14	1.82	0.096
	Protein ubiquitination	24	12	1.81	0.085
Exposed	Viral infectious cycle	22	11	1.75	0.122
Exposed	Intracellular protein transport	114	39	1.73	0.125
	Protein modification by small protein conjugation	26	13	1.68	0.158
	Phosphoinositide biosynthetic process	15	6	1.66	0.159
	Sphingolipid metabolic process	22	7	1.65	0.154
	Protein transport	122	40	1.58	0.222
	Membrane lipid metabolic process	72	21	1.56	0.248
	Establishment of cellular localization	256	58	1.56	0.231
	Oxygen and reactive oxygen species matebolic process	18	7	-1.78	0.219
	Development of primary sexual characteristics	19	6	-1.68	0.243
	Detection of stimulus	34	22	-1.66	0.236
	Excretion	26	13	-1.66	0.214
	Regulation of secretion	27	16	-1.65	0.199
	Negative regulation of protein metabolic process	35	14	-1.65	0.197
	Second messenger mediated signaling	106	62	-1.63	0.202
	Negative regulation of protein metabolic process	33	13	-1.62	0.211
Control 1	Metalion transport	85	51	-1.62	0.202
Control	Monovalent inorganic cation transport	64	39	-1.62	0.190
	Brain development	37	22	-1.61	0.196
	System process	380	179	-1.61	0.180
	Neurological system process	259	143	-1.59	0.207
	G protein signaling coupled to cyclic nucleotide second messenger	69	41	-1.58	0.218
	Transmission of nerve impulse	125	64	-1.57	0.230
	Cyclic nucleotide mediated signaling	71	-	-1.56	0.242
	Lymphocyte activation	41	-	-1.55	0.243
	Cellular defense response	31	-	-1.55	0.242

Table S5	Gene set	Enrichment	Analysis –	Database	C5:BP
Table 55	Gene set	Emiciniu	Analy 515 -	Database	C3.D1

		Annoted	Enrichment		EDD
Population	Pathway	gene	Core gene	NES	FDK q-
		number	number		value
	Proteasome complex	18	12	2.16	0.016
	Nuclear pore	21	15	2.07	0.013
	Nuclear envelope	50	24	2.03	0.020
	Integral to organelle membrane	42	19	2.02	0.016
	Organelle membrane	207	88	1.96	0.019
	Nuclear membrane part	28	17	1.95	0.018
	Endomembrane system	158	72	1.92	0.020
	Peroxisome	35	14	1.90	0.021
	Nulear membrane	33	18	1.89	0.020
Exposed	Intrinsic to organelle membrane	44	19	1.86	0.021
	Microbody	35	14	1.86	0.020
	Pore complex	25	15	1.84	0.021
	Golgi membrane	38	21	1.76	0.039
	Organelle envelope	110	34	1.66	0.067
	Envelope	110	34	1.65	0.066
	Endopla smic reticulum	194	60	1.62	0.075
	DNA directed RNA polymerase II holoenzyme	42	15	1.56	0.106
	Nuclear part	388	116	1.54	0.114
	Golgi Appartus part	83	36	1.52	0.124
	Extra cellular matrix	79	31	-1.72	0.185
	Proteina ceous extra cellular matrix	78	31	-1.71	0.097
	Spindle	30	11	-1.66	0.121
	Microtubule cytoskeleton	114	31	-1.66	0.093
	Extra cellular region part	241	124	-1.66	0.075
Control	Collagen	22	9	-1.60	0.101
	Voltage gated potassium channel complex	23	13	-1.55	0.145
	Extracellular region	313	155	-1.53	0.145
	Extracellular space	167	99	-1.53	0.134
	Cytoskeleton	271	66	-1.46	0.199
	Cytoskeletalpart	179	38	-1.45	0.208

Table S6 Gene	set Enrichment	Analysis -	Database C5:CC
-----------------	----------------	------------	----------------

PopulationPathwaygene numberCore gene numberNESFDR q- valueSignal sequence binding1562.240.007Small protein conjugating enzyme activity35152.130.013Ubiquitin protein ligase activity34142.080.014Ligase activity forming carbon nitrogen bonds48172.080.013Cysteine type peptidase activity43152.060.011Acid/amino acid ligase activity40151.990.016Small conjugating protein ligase activity36141.980.016ExposedCysteine type endopeptidase activity35141.760.077Ligase activity acting on acid anhydrides170661.650.130Hydrolase activity acting on acid anhydrides170661.650.120			Annoted	Enrichment		EDD ~
number number number value Signal sequence binding 15 6 2.24 0.007 Small protein conjugating enzyme activity 35 15 2.13 0.013 Ubiquitin protein ligase activity 34 14 2.08 0.014 Ligase activity forming carbon nitrogen bonds 48 17 2.08 0.013 Cysteine type peptidase activity 43 15 2.06 0.011 Acid/amino acid ligase activity 40 15 1.99 0.016 Small conjugating protein ligase activity 36 14 1.98 0.016 Exposed Cysteine type endopeptidase activity 35 14 1.76 0.077 Ligase activity acting on acid anhydrides 170 66 1.65 0.130	Population	Pathway	gene	Core gene	NES	FDK q-
Signal sequence binding 15 6 2.24 0.007 Smallprotein conjugating enzyme activity 35 15 2.13 0.013 Ubiquitin protein ligase activity 34 14 2.08 0.014 Ligase activity forming carbon nitrogen bonds 48 17 2.08 0.013 Cysteine type peptidase activity 43 15 2.06 0.011 Acid/amino acid ligase activity 40 15 1.99 0.016 Small conjugating protein ligase activity 36 14 1.98 0.016 Exposed Cysteine type endopeptidase activity 35 14 1.76 0.077 Ligase activity acting on acid anhydrides 170 66 1.65 0.130			number	number		value
Small protein conjugating enzyme activity 35 15 2.13 0.013 Ubiquitin protein ligase activity 34 14 2.08 0.014 Ligase activity forming carbon nitrogen bonds 48 17 2.08 0.013 Cysteine type peptidase activity 43 15 2.06 0.011 Acid/amino acid ligase activity 40 15 1.99 0.016 Small conjugating protein ligase activity 36 14 1.98 0.017 Exposed Cysteine type endopeptidase activity 35 14 1.76 0.077 Ligase activity acting on acid anhydrides 170 66 1.65 0.130		Signal sequence binding	15	6	2.24	0.007
Ubiquitin protein ligase activity 34 14 2.08 0.014 Ligase activity forming carbon nitrogen bonds 48 17 2.08 0.013 Cysteine type peptidase activity 43 15 2.06 0.011 Acid/amino acid ligase activity 40 15 1.99 0.016 Small conjugating protein ligase activity 36 14 1.98 0.016 ExposedCysteine type endopeptidase activity 35 14 1.76 0.077 Ligase activity 72 23 1.65 0.130 Hydrolase activity acting on acid anhydrides 170 66 1.65 0.120		Small protein conjugating enzyme activity	35	15	2.13	0.013
Ligase activity forming carbon nitrogen bonds48172.080.013Cysteine type peptidase activity43152.060.011Acid/amino acid ligase activity40151.990.016Small conjugating protein ligase activity36141.980.016ExposedCysteine type endopeptidase activity35141.760.077Ligase activity72231.650.139Hydrolase activity acting on acid anhydrides170661.650.130		Ubiquitin protein ligase activity	34	14	2.08	0.014
Cysteine type peptidase activity 43 15 2.06 0.011 Acid/amino acid ligase activity 40 15 1.99 0.016 Small conjugating protein ligase activity 36 14 1.98 0.016 Exposed Cysteine type endopeptidase activity 35 14 1.76 0.077 Ligase activity 72 23 1.65 0.139 Hydrolase activity acting on acid anhydrides 170 66 1.65 0.130		Ligase activity forming carbon nitrogen bonds	48	17	2.08	0.013
Acid/amino acid ligase activity40151.990.016Small conjugating protein ligase activity36141.980.016ExposedCysteine type endopeptidase activity35141.760.077Ligase activity72231.650.139Hydrolase activity acting on acid anhydrides170661.650.130		Cysteine type peptidase activity	43	15	2.06	0.011
ExposedSmall conjugating protein ligase activity36141.980.016ExposedCysteine type endopeptidase activity35141.760.077Ligase activity72231.650.139Hydrolase activity acting on acid anhydrides170661.650.130		Acid/amino acid ligase activity	40	15	1.99	0.016
ExposedCysteine type endopeptidase activity35141.760.077Ligase activity72231.650.139Hydrolase activity acting on acid anhydrides170661.650.130		Small conjugating protein ligase activity	36	14	1.98	0.016
Ligase activity72231.650.139Hydrolase activity acting on acid anhydrides170661.650.130Cooperturb binding1501.640.120	Exposed	Cysteine type endopeptidase activity	35	14	1.76	0.077
Hydrolase activity acting on acid anhydrides170661.650.130Coopertume binding1501.640.120		Ligase activity	72	23	1.65	0.139
$\begin{array}{c c} Coongrum o binding \\ 15 \\ 0 \\ 164 \\ 0 \\ 120 \\ \end{array}$		Hydrolase activity acting on acid anhydrides	170	66	1.65	0.130
		Coenzyme binding	15	9	1.64	0.120
Pyrophosphatase activity 168 66 1.64 0.114		Pyrophosphatase a ctivity	168	66	1.64	0.114
Nucleoside triphosphate activity157621.610.129	1	Nucleoside triphosphate activity	157	62	1.61	0.129
GTPase activity 62 24 1.57 0.156		GTPase activity	62	24	1.57	0.156
RNA helicase activity 16 8 1.52 0.188		RNA helicase activity	16	8	1.52	0.188
Rhodopsin like receptor activity8054-1.930.026		Rhodopsin like receptor activity	80	54	-1.93	0.026
Amine receptor activity 22 16 -1.83 0.067	1	Amine receptor activity	22	16	-1.83	0.067
Cation channel activity 81 50 -1.80 0.063	-	Cation channel activity	81	50	-1.80	0.063
G protein coupled receptor activity 121 77 -1.77 0.067		G protein coupled receptor activity	121	77	-1.77	0.067
G protein coupled receptor binding 31 20 -1.75 0.066		G protein coupled receptor binding	31	20	-1.75	0.066
Substrate specific channel activity 108 71 -1.73 0.071		Substrate specific channel activity	108	71	-1.73	0.071
Ion channel activity 103 66 -1.72 0.063		Ion channel activity	103	66	-1.72	0.063
Chemokine activity 21 12 -1.62 0.156		Chemokine activity	21	12	-1.62	0.156
Chemokine receptor binding 21 12 -1.61 0.151		Chemokine receptor binding	21	12	-1.61	0.151
Calcium channel activity 24 14 -1.61 0.148		Calcium channel activity	24	14	-1.61	0.148
Gated channel activity 86 53 -1.59 0.164	1	Gated channel activity	86	53	-1.59	0.164
Carter Cation transmembrane transporter activity 154 53 -1.58 0.162	Control	Cation transmembrane transporter activity	154	53	-1.58	0.162
ControlVoltage gated cation channel activity4531-1.570.163	Control	Voltage gated cation channel activity	45	31	-1.57	0.163
Voltage gated channel activity4933-1.550.185	1	Voltage gated channel activity	49	33	-1.55	0.185
Cytokine activity 66 32 -1.54 0.191	1	Cytokine activity	66	32	-1.54	0.191
Ion transmembrane transporter activity 203 64 -1.53 0.195		Ion transmembrane transporter activity	203	64	-1.53	0.195
Transmembrane receptor activity 277 137 -1.51 0.211	1	Transmembrane receptor activity	277	137	-1.51	0.211
Hormone activity 31 14 -1.50 0.211	1	Hormone activity	31	14	-1.50	0.211
Pattern binding 29 19 -1.49 0.214		Pattern binding	29	19	-1.49	0.214
Metalion transmembrane transporter activity 104 62 -1.48 0.221		Metalion transmembrane transporter activity	104	62	-1.48	0.221
Protein C terminus binding 501.48 0.225		Protein C terminus binding	50	-	-1.48	0.225
Extra cellular matrix structural constituent 201.47 0.225		Extracellular matrix structural constituent	20	-	-1.47	0.225
Receptor binding 2661.46 0.225		Receptor binding	266	-	-1.46	0.225
Motor activity 211.46 0.217		Motoractivity	21	-	-1.46	0.217

Table S7	Gene set Enrichment Analysis – Database (C5:MF
----------	---	-------

L'objectif de cette étude non prévue initialement dans le projet EPAPP était de mettre en évidence un potentiel effet intergénérationnel d'une exposition gestationnelle des lapines Fo à la pollution de l'air par des gaz de moteur diesel, sur le développement fœto-placentaire F2 (issus de la voie femelle). Ce protocole prolongeait le protocole initial du projet EPAPP, et a porté sur les femelles F1 exposées pendant leur vie *in utero* et leur descendance.

Nos analyses ont montré que la biochimie sanguine des lapines F1 à l'âge adulte et en fin de gestation ne semblait pas être altérée par rapport aux contrôles, cependant la concentration en acides gras des lipides neutres de leur foie était augmentée, suggérant une stéatose hépatique. Dans les placentas F2, la concentration en acides gras des lipides neutres, reflétant le stockage intracellulaire lipidique, était augmentée et les profils en acides gras étaient significativement différents entre les groupes. Dans le plasma fœtal F2, la proportion d'acides gras polyinsaturés de la série n-3, précurseurs de molécules anti-inflammatoires, était augmentée alors que celle de l'acide arachidonique, précurseur de molécules pro-inflammatoires, était diminuée. Aucune différence de structure placentaire n'a été mise en évidence. Néanmoins, les analyses d'enrichissement de réseaux de gènes (GSEA) des données de transcriptomique placentaire ont montré un enrichissement des réseaux de gène impliqués dans la formation du protéasome et des exosomes alors que les voies de régulation de l'inflammation apparaissaient réprimées dans les placentas du groupe exposé par rapport aux témoins.

Une exposition gestationnelle aux d'échappement de moteur diesel entraine des effets intergénérationnels sur le métabolisme des unités fœto-placentaires de la deuxième génération.

Partie D

Discussion et perspectives

Partie D : Bilan, discussion et perspectives

1. Projet EPAPP – résumé de l'ensemble des données

Le projet EPAPP avait pour but d'évaluer les effets d'une exposition maternelle pendant la gestation aux gaz d'échappement de moteur diesel sur le développement embryonnaire, fœto-placentaire et post-natal ainsi que les effets intergénérationnels dans un modèle lapin.

1.1. Travaux de thèse

L'objectif de cette thèse était d'explorer les effets d'une exposition gestationnelle au gaz d'échappement de moteur diesel à des concentrations proches de celles auxquelles les populations urbaines sont exposées en Europe, sur le développement fœto-placentaire de la première et la deuxième génération, dans un modèle lapin.

1.1.1. Développement fœto-placentaire F1

A 28jpc et après 20 jours d'exposition aux gaz d'échappement de moteur diesel, les analyses en microscopie électronique ont démontré le passage des particules de diesel inhalées à travers la barrière pulmonaire et leur capacité à atteindre le sang maternel. Cependant, aucune différence de biométrie des organes ou de dérégulations de la biochimie sanguine des lapines Fo n'a été observée. Dans les plasmas de ces lapines, les profils en acides gras différaient peu. Ces résultats peuvent être expliqués par la consommation d'un même régime alimentaire et de leur gestation, période au cours de laquelle leur métabolisme lipidique est adapté à la demande accrue du fœtus en développement (Innis 1991; Cetin et al. 2009). Cependant, des cellules circulantes, nécessitant une caractérisation précise, ont été observées dans les espaces maternels sanguins des placentas. L'inhalation de gaz d'échappement de moteur diesel est associée à l'induction d'une phase aigüe de l'inflammation dans les poumons des individus exposés (Saber et al. 2013; Saber et al. 2014), avec une augmentation du nombre de monocytes et de leukocytes circulants (Xu et al. 2013). Néanmoins, la prise en charge et l'action biologique des particules par les macrophages dans les poumons dépend de la corona protéique qui se forme à leur entrée dans l'organisme (Shaw et al. 2016). Finalement, ces



Figure D.1 | Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour le développement fœto-placentaire F1.

A mi gestation, des signes de souffrance fœtale ont été observés. A 28 jpc, des signes d'hypotrophie fœtale, des dérégulations du métabolisme fœtal, des défauts de vascularisation placentaire, des dérégulations de l'expression génique placentaire ont été observés. De plus, le transfert transplacentaire de nanoparticules a été mis en évidence. Les profils en AG des mères Fo, des placentas et des fœtus F1 ont AG: Acides gras; IGF1: Insulin-like Growth Factor 1; jpc: jour post-conception; PL: Phospholipides. été perturbés par l'exposition maternelle. aspects d'inflammation locale au sein du poumon et générale par la présence de cytokines pro-inflammatoires circulantes (Xu *et al.* 2013), telle que l'IL6 (*Interleukine* 6), n'ont pas été analysés chez les lapines Fo. Cependant, la recherche de particules va être effectuée par microscopie électronique au sein des foies et des rates maternelles.

A mi-gestation, une réduction de la longueur de la tête et du pouls au niveau de l'aorte fœtale a été observée, suggérant des signes de retard de croissance et de souffrance fœtale (Figure D.1). A 21jpc, aucune différence n'est observée entre les deux groupes. A ce stade, nous pourrions émettre l'hypothèse d'une adaptation placentaire fonctionnelle pour rétablir une croissance fœtale optimale. Ce type d'adaptations placentaires a été observé chez la souris en cas de surnutrition maternelle (Sferruzzi-Perri et al. 2013). Quelques jours avant le terme, une réduction de la longueur de la tête, une tendance à la réduction du périmètre abdominal et une diminution de l'efficacité placentaire ont été observées, suggérant de nouveau des signes d'hypotrophie fœtale. Une réduction des flux sanguins intra-placentaires observée par Power Doppler Analysis a été confirmée par l'analyse stéréologique post-mortem qui a démontré une réduction du volume relatif des vaisseaux fœtaux, comme cela a été montré dans un modèle de primates non humain exposé à un régime obésogène (Frias et al. 2011). Ces défauts de vascularisation placentaires suggèrent que l'exposition chronique aux gaz d'échappement de moteur jusqu'en fin de gestation induit des dommages irréversibles ne permettant plus la mise en place d'adaptations placentaires.

L'analyse des profils en acides gras dans le placenta a montré une réduction significative de la concentration en acides gras des phospholipides constituants des membranes cellulaires. Cette diminution est cohérente avec les résultats obtenus en stéréologie démontrant une réduction du volume des vaisseaux fœtaux et du trophoblaste. Peu de différences ont été observées pour les lipides neutres qui correspondent au stockage lipidique intracellulaire. Cependant la diminution de la proportion en DGLA sans modification de celle en AA et LA pourrait refléter une plus grande production de molécules anti-inflammatoires, suggérant une adaptation placentaire face à une probable augmentation de l'inflammation bas-grade des lapines Fo (King 1996-2016).

Grâce à l'analyse d'enrichissement (GSEA) réalisée sur les données de transcriptomique obtenues avec un microarray, de faibles dérégulations de l'expression

génique ont été observées dans les placentas. Néanmoins ces réseaux de gènes régulent négativement la croissance cellulaire («*Regulation of cell growth*»), contrôlent le transport transmembranaire des acides aminés (« *Amino acid transmembrane transporter activity* ») et sont responsables du métabolisme des acides gras (« *Fatty acid metabolic process* »). Ces perturbations pourraient expliquer en partie les défauts de structure placentaire avec la diminution du volume des vaisseaux fœtaux et du trophoblaste (régulation négative de la croissance cellulaire), l'hypotrophie fœtale (transport transplacentaire des acides aminés) et les légères différences de profils placentaires en acides gras (enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras).

De plus, grâce à la microscopie électronique à transmission, des particules ont été observées en amas diffus en contact des microvillosités riches en transporteurs et sous forme de grosses particules, d'un diamètre de 200 à 300 nm, présentant une structure de type « finger-print ». Dans les cellules trophoblastiques, des particules ont été observées dans le cytoplasme (diamètre autour de 30-40 nm), dans les noyaux, dans des endosomes et sous forme de « finger-print ». Enfin, des nanoparticules ont été observées dans les érythrocytes fœtaux et des «finger-print» ont été observées dans la lumière des vaisseaux fœtaux. Nous avons émis l'hypothèse d'une dérégulation du métabolisme du fer au sein des placentas car il a été montré, qu'en cas d'injection de nanoparticules d'oxyde de fer chez la souris, ces nanoparticules étaient prises en charge par la ferritine, celle-ci avait ensuite tendance à s'agréger dans des structures lysosomales qui par un processus de biodégradation formaient les « finger-print » (Levy et al. 2011). De plus, ces analyses ont démontré le transfert transplacentaire des nanoparticules de diesel. Des analyses ultrastructurales complémentaires en microscopie électronique ont permis d'établir que ces particules pouvaient atteindre le foie et la rate des fœtus, démontrant pour la première fois que le transfert transplacentaire de particules diesel inhalées et leur capacité à atteindre les organes fœtaux. Le transfert transplacentaire de nanoparticules avait été démontré après inhalation de nanoparticules manufacturées d'oxyde cadmium de 4,5 à 16,5 jpc (Blum et al. 2012) ou après injection à 16 et 17 jpc de nanoparticules manufacturées de silice et dioxyde de titane (Yamashita et al. 2011).

Enfin, nous avons établi que les fœtus F1 présentaient une hypoinsulinémie associée à une diminution de la concentration plasmatique en IGF1 comme observé dans un modèle de retard de croissance chez le rat (Hill *et al.* 1983; Hill & Milner 1985). Une



Figure D.2 | Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour le développement fœto-placentaire F2.

AA: Acide arachidonique; AG: Acides gras; jpc: jour post-conception; DHLA: Acide dihomo-y-linolénique; LA: Acide linoléique; LC PUFAs: Acides gras polyinsaturés à longue chaîne; MUFAs: Acides gras monoinsaturés.

A 28 jpc, aucune différence de biométrie fœto-placentaire n'a été observée. Une augmentation de la concentration en triglycérides et une diminution de celle en cholestérol ont été démontrées. Des dérégulations d'expression génique placentaire ont été démontré sans effet sur la structure. Enfin, les profils en AG des mères F1, des placentas et fœtus F2 ont été perturbés par l'exposition in utero. réduction de la concentration plasmatique en IGF1 a été observée en cas de RCIU chez le lapin (Thakur *et al.* 2000) et dans plusieurs cas de manipulations de l'apport nutritif au fœtus sans variation de la concentration en IGF2 (Fowden 2003). Etant donné l'implication de ces deux facteurs, insuline et IGF1, dans la croissance, la diminution de leur concentration plasmatique chez les fœtus F1 pourrait en partie causer les signes d'hypotrophie.

1.1.2. Développement fœto-placentaire F2

L'objectif de cette partie était d'observer les effets d'une exposition *in utero* des lapines F1 sur le développement fœto-placentaire F2. Les résultats obtenus sur la deuxième génération sont récapitulés dans la **Figure D.2**.

Les mesures de biochimie sanguine effectuées chez les femelles gravides F1 à 28 jpc n'ont pas démontré de différence significative entre les deux groupes. Contrairement à l'âge de 5 mois (voir **D§1.2.3.**), ces lapines n'étaient plus hypertriglycéridémiques. L'absence de dyslipidémie pourrait résulter de leur condition de gestation avec un métabolisme lipidique adapté pour l'apport au fœtus en développement (Herrera & Ortega-Senovilla 2014). L'exposition *in utero* aux gaz d'échappement de moteur diesel entrainait, dans le foie de lapines F1, une augmentation de la concentration totale des acides gras de stockage (lipides neutres), suggérant une stéatose hépatique confirmée en histologie.

Chez les fœtus F2 à 28 jpc, aucune différence de biométrie fœto-placentaire n'a été mise en évidence. Par contre, une augmentation de la concentration plasmatique en triglycérides ainsi qu'une diminution de la concentration en cholestérol total et non-HDL ont été observées. Dans les plasmas fœtaux, la concentration totale en acides gras est augmentée probablement liée à l'augmentation des triglycérides circulants, et non aux esters de cholestérol car la concentration plasmatique fœtale en cholestérol est réduite. L'hypertriglycéridémie fœtale pourrait être liée à une augmentation des triglycérides circulants chez la mère (Picone *et al.* 2011; Mazzucco *et al.* 2013; Tarrade *et al.* 2013), cependant les lapines F1 ne l'étaient pas à ce stade, ou à une perturbation du métabolisme lipidique placentaire.

A 28 jpc, aucune différence structurale placentaire n'a été démontrée. Cependant, grâce à l'analyse d'enrichissement (GSEA) réalisée sur les données de transcriptomique



Figure D.3 | Présentation des différents intervenants du projet EPAPP.

A 6jpc, les embryons F1 ont été pour le suivi du développement embryonnaire. Au stade 28 jpc, les unités fœto-placentaires F1 et F2 ont été collectés (sujet de cette thèse) et le développement des glandes mammaires Fo et F1 a été suivi. De la naissance à l'âge adulte, le poids des animaux F1 a été suivi, un suivi physiologique a été effectué sur les animaux F1 de 4,5 à 7,5 mois. Les gonades ont été prélevées chez les fœtus des 2 générations ainsi que chez les adultes F1. Le projet Brain AirPoll (thèse d'E. Bernal-Melendez) apparaît en rouge sur ce schéma. obtenues avec un microarray, des dérégulations de l'expression génique ont été observées. Les réseaux de gènes qui ont été enrichis, dans les placentas issus des mères exposées in utero, codent pour la machinerie de dégradation des protéines (« Proteasome complex », « Ubiquitin protein ligase activity » et « Ubiquitin mediated proteolysis ») et la formation des exosomes (« RNA degradation »). La formation et le relargage des exosomes varient en réponse à un changement d'environnement local tel que la pression en oxygène, la concentration en glucose ou en acides gras (Mitchell et al. 2015). Une surexpression des composants des exosomes pourrait refléter une fonction et un métabolisme placentaires perturbés (Mitchell et al. 2015), ce qui est cohérent avec les différences de profils en acides gras placentaires et les perturbations métaboliques observées chez les fœtus. Les réseaux réprimés chez les exposés codent pour des molécules pro-inflammatoires (« Systemic lupus erythematosus », « Allograft rejection », « Graft versus hist disease » et « Autoimmune thyroid disease »), suggérant la mise en place d'adaptations placentaires limitant l'inflammation. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'il existe également une diminution du stockage d'acide arachidonique, précurseur de molécules pro-inflammatoires et une augmentation du stockage des acides gras monoinsaturés de la série n-3, précurseurs de molécules anti-inflammatoires. Enfin, une augmentation de la concentration totale en acides gras de stockage est observée, indiquant une augmentation du transfert d'acide gras vers le fœtus, en cohérence avec l'hypertriglycéridémie fœtale (Tarrade et al. 2013).

1.2. Travaux du projet EPAPP

Dans cette partie, nous allons présenter les premiers résultats obtenus dans les autres volets du projet EPAPP puis les résultats seront discutés en fonction de ceux obtenus au cours de la thèse. L'ensemble du projet EPAPP et des différents intervenants est présenté dans la **Figure D.3**. Les effectifs utilisés dans chaque volet du projet sont présentés dans les **Tableaux D.1** et **D.2**.

1.2.1. Développement embryonnaire F1

Cette partie du projet EPAPP s'intéresse au développement embryonnaire suite à l'exposition aux gaz d'échappement de moteur diesel, ce volet a été pris en charge par Véronique DURANTHON.

	Stade d'analyse	Nombre de témoins	Nombre d'exposés
Embryons (6 jpc)		185	215
Lactation	Glande mammaire (28jpc)	5	7
Lactation	Lait (4 et 16 jpn)	7	9

Tableau D.1 | Effectifs des volets EPAPP embryons et glandes mammaires

Pour le stade 6 jpc, le nombre indiqué est le nombre d'embryons collectés. Pour l'étude de la lactation, il s'agit du nombre de lapines sur lesquelles les glandes mammaires (28 jpc) et le lait (4 et 16 jpn) ont été prélevés.

Age	Nombre d'individus témoins				Nombre d'individus exposés			
	Mâles		Femelles		Mâles		Femelles	
4,5 mois	11		14		16		32	
7,5 mois	Challenge		Nullinara	Costanto	Challenge		Nullinaro	Costanto
	Contrôle	OB	Nullipare	Gestante	Contrôle	OB	Nullipare	Gestante
	6	6	4	3	10	6	8	10

Tableau D.2 | Effectifs du volet EPAPP pour le suivi physiologique des individus F1

Les mâles ont été abattus à 7,5 mois. Les femelles nullipares ont été abattues à 7,5 mois pour l'analyse des ovaires. Les femelles gestantes ont générés les fœtus F2. La différence entre le nombre de femelles à 4,5 et à 7,5 mois provient de femelles retirées des effectifs pour des raisons physiologiques, qui n'ont pas été positive pour la gestation ou qui ont été envoyées à Nancy dans le cadre du projet Brain Air Poll. Des embryons provenant de lapines exposées ou non ont été collectés à 6 jpc (soit 3 jours d'exposition). L'embryoblaste a été séparé du trophoblaste pour des analyses fonctionnelles en transcriptomique avec le même microarray que celui utilisé pour les analyses placentaires. L'analyse transcriptomique a été réalisée sur des pools d'échantillons pour l'embryoblaste et pour le trophoblaste. Les premières analyses d'expression génique différentielle n'ont pas montré de différence à la fois dans l'embryoblaste et le trophoblaste, bien que les profils d'expression soit distinct entre les deux tissus. Les analyses d'enrichissement *via* GSEA, identiques à celles réalisées sur les données placentaires, ont permis de mettre en évidence l'enrichissement de réseaux de gènes, tels que « Lysosome », « Metabolism of vitamins and cofactors » et « Cholesterol biosynthesis », mais aucun n'était commun aux analyses des placentas à 28 jpc. Par la suite, les placentas ont été analysés à l'aide d'autres bases de données, KEGG et GO. Les analyses sur les embryons et les comparaisons des deux stades méritent donc d'être approfondies.

Ces résultats démontrent, pour l'instant, que les réseaux de gènes qui semblent être perturbés par l'exposition maternelle diffèrent en fonction du stade. Tout d'abord, les stades d'étude sont peut-être trop précoce (6 jpc) et trop tardif (28 jpc) pour mettre en évidence de réelles dérégulations géniques. L'expression des gènes au cours de la gestation évolue selon certaines cinétiques comme cela a été démontré pour les transporteurs du glucose par exemple chez l'homme (Lager & Powell 2012) ou le lapin (Khan *et al.* 2011). De plus, les embryons à 6 jpc sont issus de lapines exposées uniquement pendant 3 jours aux gaz d'échappement de moteur diesel alors que les placentas à 28 jpc sont issus de mères exposées pendant 20 jours ce qui représente une exposition chronique compte tenu de la durée de gestation qui est de 31 jpc. Les perturbations et/ou adaptations fonctionnelles ne sont donc probablement pas similaires au vu du nombre de jours d'exposition associé à chaque stade. De plus, les adaptations fonctionnelles sont montrées comme transitoires dans un modèle de souris gravides soumises à un régime obésogène (Sferruzzi-Perri *et al.* 2013).

1.2.2. Glande mammaire et lactation F1

La période post-natale précoce, au cours de la lactation, est une fenêtre de sensibilité pour la maturation des systèmes neuronaux et la programmation de pathologies. Madia CHARLIER a été responsable de cette partie du projet EPAPP.

Les glandes mammaires ont été collectées à 28 jpc sur la série de lapines abattues à 28 jpc pour l'analyse du développement fœto-placentaire et sur la série de lapines qui a donné naissance aux individus F1 pour le prélèvement du lait à 4 jpn (début de la lactation) et 16 jpn (pic de lactation).

Au stade 28 jpc, les glandes mammaires sont en fin de phase de différenciation, se déroulant sur la deuxième moitié de la gestation. Sur les coupes histologiques, les glandes mammaires des lapines exposées présentaient plus de globules gras et de micelles de caséine dans la lumière des acini. Une quantification, grâce au logiciel Image J, a été réalisée afin de valider les observations histologiques. La surface occupée par les globules gras était significativement plus élevée dans les glandes mammaires du groupe exposé que chez les témoins. De plus, la composition en acides gras dans le lait prélevé à 4 jpn était différente entre les deux groupes. La concentration en acides gras saturés et polyinsaturés de la série n-6 était augmentée dans le groupe exposé. A 16 jpn, aucune différence de composition en acides gras dans le lait n'a été observée. La consommation de lait par les lapereaux a été mesurée en pesant les petits avant et après la tétée, elle n'était pas différente entre les deux groupes quelque soit le stade d'analyse. Nous pouvons donc conclure, qu'à consommation équivalente, les lapereaux exposés *in utero* ont reçu un lait plus gras à 4 jpn.

La biochimie sanguine mesurée sur les lapines Fo n'a montré aucune différence, la perturbation métabolique serait donc localisée à la glande mammaire. Cependant, ni la leptine circulante, ni les acides gras non estérifiés n'ont été mesurés dans les plasmas de ces lapines. De plus, le métabolisme des lapines a pu être modifié plus tôt dans la gestation et induire ces perturbations métaboliques au sein de la glande mammaire.

Les perturbations biométriques et métaboliques des fœtus F1 associées à un environnement très riche en période post-natale précoce pourrait entrainer la programmation développementale des pathologies cardiovasculaires (Hales & Barker 1992, 2001).

1.2.3. Physiologie des adultes F1

Un suivi physiologique des animaux F1 a été réalisé afin d'observer l'apparition de perturbations liées à l'exposition in utero aux gaz d'échappement de moteur diesel, ce volet a été géré par Delphine RALLIARD-ROUSSEAU.

Les animaux de la génération F1 ont été suivis individuellement de 9 jpn à l'âge adulte (7,5 mois). Tout d'abord, le suivi de poids de 9 jpn au sevrage a démontré que les individus exposés *in utero* avaient un poids plus faible que ceux du groupe témoin. Une croissance de rattrapage a ensuite été observée après le sevrage et aucune différence de poids corporel n'a été observée à l'âge adulte (7,5 mois). La période de lactation, où les lapines n'étaient plus exposées, aurait permis aux descendants F1 de rattraper leur retard de croissance post-natal.

Des analyses physiologiques (tension artérielle, composition corporelle, biochimie sanguine) ont été entreprises sur les animaux F1 âgés de 4,5 à 7,5 mois. Les mâles F1 présentaient une augmentation de la pression artérielle, une hyperglycémie, une réduction du cholestérol HDL, une diminution du rapport entre les poids de masse grasse et poids corporel mais une augmentation de la masse grasse péri-rénale, définissant un syndrome métabolique. Les femelles F1 présentaient une hypertriglycéridémie et une diminution de la masse maigre et de la densité osseuse, ces perturbations suggèrent une dérégulation du métabolisme énergétique et osseux chez ces individus. L'exposition in utero au gaz d'échappement de moteur diesel a induit une réponse différente selon le sexe de l'individu. Les effets observés sur les paramètres analysés semblent moins délétères chez les femelles que chez les mâles, ce type de réponse dépendante du sexe a déjà été mis en évidence dans un modèle souris (Bolton et al. 2012). Cependant, la soumission des souris femelles F1 à un challenge alimentaire semble exacerber les effets de l'exposition in utero aux gaz d'échappement de moteur diesel, soulignant la susceptibilité de ces femelles à développer un syndrome métabolique dans un environnement nutritif riche (Bolton et al. 2012). Grâce à ces résultats, nous pourrions émettre l'hypothèse que les perturbations métaboliques observées chez les mâles F1 pourraient avoir des conséquences sur le phénotype de leurs descendants F2 (Jimenez-Chillaron et al. 2009). Néanmoins, dans notre étude, seules les femelles F1 ont été mises à la reproduction pour générer une deuxième génération, la voie mâle n'a pas été étudiée.

1.2.4. Gonades F1 du stade fœtal à l'âge adulte

Le développement gonadique a été analysé aux stades fœtal et adulte dans les deux sexes et cette partie du projet EPAPP a été prise en charge par Geneviève JOLIVET.

Tout d'abord, la proportion de mâles et de femelles F1 a été identique dans les deux groupes, indiquant que l'exposition maternelle n'a pas influencé la différenciation sexuelle.

A 28 jpc, aucune anomalie morphologique et de développement n'a été observée grâce aux analyses histologiques et immunohistologiques. Les dosages d'AMH (hormone anti-müllerienne, qui joue un rôle fondamental dans la différenciation des gonades mâles et possède un rôle de régulation dans la folliculogenèse chez les femelles) n'ont pas montré de différence entre les deux groupes. Les stéroïdes ne peuvent être dosés à ce stade car ils ne sont pas détectés par les techniques actuelles.

A l'âge adulte, chez les femelles, aucune différence de morphologie des ovaires, ni de développement folliculaire (présence de toutes les classes) n'a été mis en évidence. Les dosages de testostérone, d'œstradiol et d'AMH n'ont pas montré de différence entre les deux groupes, laissant supposer, pour le dosage d'AMH, que la réserve ovarienne n'est pas affectée par l'exposition maternelle. Enfin, le nombre de cellules germinales était équivalent dans les deux groupes, suggérant que la différenciation des divers types cellulaires n'a pas été affectée par l'exposition maternelle.

A l'âge adulte, chez les mâles, le sperme épididymaire a été analysé. Aucune différence n'a été montrée pour les paramètres de mobilité (vélocités moyenne, droite, curviligne, l'amplitude du déplacement latéral de la tête, fréquence de battement), cependant une augmentation de la fragmentation de l'ADN a été observée. Le métabolisme oxydatif est connu pour perturber les enzymes de réparation de l'ADN dans le testicule, ce qui pourrait être à l'origine de l'augmentation de la fragmentation. Cette augmentation de la fragmentation chez les mâles F1 pourrait entrainer des défauts de développement embryonnaire de la deuxième génération. Ces résultats complètent l'hypothèse émise sur la possibilité d'effets intergénérationnels par la voie mâle.
2. Discussion et mise en perspective des résultats obtenus

2.1. Concentration utilisée pour l'exposition

Dans cette étude, nous avons fait le choix d'exposer les animaux à des concentrations représentatives de pics de pollution des grandes villes européennes (80µg/m³ en moyenne journalière). Nous pourrions nous demander si ce type d'exposition chronique est réaliste car les pics de pollution ne durent que quelques jours et non pas les 9 mois de grossesse en Europe (http://www.airparif.asso.fr/). En Europe, le seuil d'alerte à la pollution aux particules fines est de 50 µg/m³ en moyenne journalière pour les PM2,5 et de 80µg/m³ pour les PM10. En 2015, en lle de France, il y a eu entre 41 et 66 jours de dépassement du seuil journalier basé sur les recommandations pour les PM10 (AirParif 2016b). La différence entre les nombres de jours de dépassement provient de la localisation des stations de mesure, les plus touchées étant celles proches du trafic routier. Cependant en Inde ou dans les pays asiatiques par exemple, ces concentrations moyennes sont largement dépassées au quotidien (Whiting 2014). Les femmes enceintes en Europe ne sont donc pas exposées à ces concentrations élevées tout au long de leur grossesse alors que dans d'autres pays l'exposition à des concentrations largement supérieures à celle utilisée dans notre étude est continue.

Dans notre étude, les lapines ont été exposées à des épisodes courts sur la quasi totalité de la gestation afin de mimer les conditions de transport des individus en milieu urbain. Plusieurs études, dont la notre, ont montré que la pollution atmosphérique pouvait agir comme un perturbateur endocrinien (Ono *et al.* 2008; Li *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2010). Or, les perturbateurs endocriniens sont connus pour être plus toxiques à faible dose au cours d'une exposition chronique qu'une unique dose forte, indiquant des effets cumulatifs (Gore *et al.* 2015). Une exposition avec des doses plus faibles sur un épisode plus long au cours de la journée pourrait avoir des effets encore plus délétères que ceux observés dans cette étude.

2.2. Puissance, fonctionnement et émissions du moteur diesel

Le moteur diesel (25KVA) utilisé au cours de nos expérimentations serait moins récent que les moteurs diesel de la majorité du parc automobile diesel. De plus, le fonctionnement du moteur est constant et stationnaire comparé aux accélérations et ralentissement du moteur d'un véhicule en marche. Cette constance permet la

reproductibilité des paramètres pour une exposition chronique (MAPCEL, RIVM). Le moteur utilisé émet probablement plus de HAP et de résidus d'huile que les moteurs diesel récents. La technologie des moteurs diesel évolue sans cesse afin de limiter les émissions polluantes, les filtres sont de plus en plus performants ce qui induit l'émission de particules plus fines que celles émises par le moteur de notre étude. Les moteurs récents sont peut-être « moins polluants » en termes de quantité d'émissions mais ils produiraient plus de particules ultrafines. Cependant les particules les plus fines sont celles qui pénètrent le plus profondément l'organisme et possèdent la toxicité la plus importante.

La composition des gaz d'échappement peut donc varier légèrement d'un moteur à l'autre. Le type, la puissance et le fonctionnement du moteur diesel est donc un autre élément à prendre en compte dans la comparaison des études des effets de l'inhalation des gaz d'échappement sur la santé.

2.3. A quoi sont dus les effets sur les unités fœto-placentaires F1?

Les gaz d'échappement de moteur diesel sont composés d'une fraction volatile et d'une fraction particulaire. Les effets observés sur les unités fœto-placentaires F1 sont-ils dus aux particules diesel ou aux composés de la phase volatile comme les gaz toxiques (oxydes d'azote ou de carbone) ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)? Afin d'étudier les effets des HAP sur la santé des individus, des souris ont été exposées aux HAP par injection sous-cutanée de 2mg/mL de HAP à raison d'une injection par semaine, deux fois 3 semaines séparées de 3 semaines sans injection, pendant les 9 semaines précédant la conception. Cette exposition entrainait un RCIU et des défauts de vascularisation placentaire (Detmar et al. 2008). Dans cette étude, des défauts sont observés au niveau de la vascularisation artérielle globale fœtale, alors que l'examen des vaisseaux fœtaux au niveau du labyrinthe révèle la mise en place d'une ramification vasculaire plus importante, suggérant une adaptation placentaire à ce niveau. Les HAP étant les composants majeurs des fumées de cigarette, ces résultats seraient similaires à ceux observés chez la femme enceinte fumeuse (Detmar et al. 2008). Dans notre étude, il se pourrait que les HAP présents dans les gaz d'échappement contribuent aux défauts de vascularisation placentaire que nous avons mis en évidence. Cependant, l'exposition chronique gestationnelle et non pré-conceptionnelle de notre étude, empêcherait la mise

en place d'adaptations placentaires suffisamment efficaces permettant le maintien d'une croissance fœtale optimale. Une étude chez l'homme adulte a analysé les effets des nanoparticules de carbone d'une part ($70\mu g/m^3$), de la fraction volatile d'autre part ($6\mu g/m^3$) et de la combinaison des deux ($348\mu g/m^3$) (Mills *et al.* 2011). Les sujets ont été exposés quatre fois 2h avec deux semaines d'intervalle entre les expositions et ont été exposés à tous les types d'exposition. Il a été montré que les effets délétères sur la fonction cardiovasculaire, des gaz d'échappement de moteur diesel, étaient atténués lorsque ces gaz étaient filtrés à l'aide d'un filtre en téflon dans le but de retirer la majorité des particules. Cependant, inhalées seules, les nanoparticules de carbone n'entrainent pas de défauts cardiovasculaires. Lorsque des nanoparticules de diesel en suspension sont appliquées sur des anneaux aortiques de rat, elles entrainent des défauts de vasodilatation dus aux composants organiques solubles et insolubles présents à la surface de particules (Mills *et al.* 2011). Les effets délétères seraient donc dus aux particules présentes dans les gaz d'échappement mais leurs actions ne sont toxiques qu'en présence de la phase volatile (Mills *et al.* 2011).

Il est donc difficile de séparer les effets causés par la fraction volatile de ceux causés par les particules, leurs actions étant combinées. Les effets observés en première génération résulteraient donc de la combinaison de la fraction volatile avec les particules.

2.4. Comment expliquer les effets sur la deuxième génération ?

Les effets intergénérationnels peuvent être causés par l'exposition *in utero* des gonades en développement de la génération F1, de la programmation d'un phénotype délétère chez les descendants F1 se répercutant sur les individus F2 ou d'une altération de l'épigénome des cellules germinales ou somatiques. Dans notre étude, les effets sur la deuxième génération ne peuvent provenir que de la voie maternelle, les mâles utilisés pour les saillies étant tous des mâles contrôles. Quelle est la voie la plus probable pour expliquer les effets observés sur le développement fœto-placentaire de la génération F2?

La première hypothèse d'effets transgénérationnels résultant d'un défaut de développement gonadique chez la mère F1 est nuancée entre les données disponibles qui n'indiquent aucun problème majeur de fertilité (pas d'anomalie de morphologie, pas d'anomalie dans le développement et la réserve des follicules) et la possibilité de mise en

place de marques épigénétiques qui pourraient être responsables des effets sur la génération F2.

De plus, aucune particule n'a été observée dans les foies des femelles adultes F1, ni dans les placentas ou dans les organes des fœtus F2 infirmant notre deuxième hypothèse d'un effet direct des gaz d'échappement de moteur diesel jusque sur la génération F2.

Cependant, les individus F1 présentaient des anomalies métaboliques. Tout d'abord, des particules dans les foies des fœtus F1 ont été observées, ce qui pourrait entrainer des anomalies hépatiques à l'âge adulte. De plus, une hypotrophie fœtale ainsi qu'une hypoinsulinémie ont été observées chez les fœtus F1 exposés *in utero*. Enfin, une hypertriglycéridémie a aussi été observée à l'âge adulte chez les femelles F1. Les effets observés chez les fœtus F1. L'hypothèse la plus probable est donc un effet indirect des gaz d'échappement *via* la programmation développementale d'un phénotype délétère des F1 à l'âge adulte.

2.5. Mise en perspective de ces travaux par rapport aux données épidémiologiques

Le projet E-DOHAD qui finance une partie de ces travaux et qui est porté par Rémy SLAMA, épidémiologiste à l'institut Albert Bonniot de Grenoble, a pour objectif de caractériser les effets d'une exposition chez la femme enceinte à la pollution atmosphérique sur la santé des enfants. L'exposition à la pollution est estimée grâce au carbone suie, au dioxyde d'azote, aux composés organiques volatiles, aux données GPS et au PM_{2,5}. La cohorte SEPAGES inclut 500 femmes suivies par échographie au cours de leur grossesse et un suivi de leurs enfants jusqu'à l'âge de 3 ans, notamment de la fonction pulmonaire à l'âge de 2 mois, la croissance post-natale et le développement neurologique. De plus, la méthylation de l'ADN placentaire et du cordon ombilical est analysée.

Ces analyses épidémiologiques vont permettre de mettre nos propres résultats en perspective des effets d'une exposition humaine à la pollution atmosphérique.

3. Forces et limites de cette étude

3.1. Choix du modèle lapin

Comme décrit dans la Partie B, le lapin a été choisi pour la structure de son placenta, plus proche de l'homme que celui des rongeurs, pour sa taille qui permet un suivi échographique, sa période intergénérationnelle courte, son métabolisme des lipides, la taille de son embryon et enfin pour les outils de transcriptomique disponibles.

Cependant, le lapin présente quelques désavantages en tant que modèle biomédical. Chez la lapine, la taille de la portée est de 7 à 12 lapereaux contrairement aux grossesses uniques ou gémellaires chez la femme. Chez la souris, il a été montré en conditions normales qu'il existait une différence de poids entre tous les fœtus et les placentas en fonction de leur position dans la corne utérine (Coan *et al.* 2008). Au laboratoire, après avoir analysé plusieurs cohortes de fœtus témoins provenant de différents projets, de différentes années et de saisons, nous avons pu observer le même phénomène chez la lapine (Chavatte-Palmer *et al.* 2008). Ces observations nous ont amenés à prendre en compte la position du fœtus dans la corne dans le modèle statistique. L'autre inconvénient de ce modèle animal est la longueur de sa gestation, qui est seulement de 31 jours comparés aux 9 mois dans l'espèce humaine. Du fait de ce temps court de gestation, il est probable que les adaptations placentaires liées à une exposition chronique ne puissent pas se mettre en place.

Néanmoins, le lapin reste un meilleur modèle que les rongeurs dans le monde de la toxicologie et de la tératologie.

3.2. Exposition

Dans cette étude, pour rappel, les lapines ont été exposées (exposition nasale) de 3 à 27 jpc, 2 fois une heure par jour, 5 jours par semaine, à de l'air filtré pour les contrôles ou à des gaz d'échappement de moteur diesel dilué et filtré (1mg/m³, diamètre moyen des particules : 69nm) représentatif des gaz d'échappement émis par des véhicules diesel équipés de filtres à particules.

3.2.1. Forces

Les dispositifs utilisés dans notre étude (« tubes ») permettent une exposition seulement au niveau de museau. Contrairement aux expositions en chambre, technique

plus couramment utilisée pour les études d'inhalation, où l'exposition des animaux se fait sur corps entier, les particules se déposant sur leur pelage. Au cours du toilettage, les animaux ingèrent des particules en quantité non négligeable mais surtout non quantifiable. Or il a été montré que certaines nanoparticules ingérées, notamment le dioxyde de titane, sont capables de traverser l'épithélium intestinal (Brun *et al.* 2014). De plus, l'exposition par inhalation, quoique plus complexe à mettre en place, induit une réponse plus proche de l'Homme qu'une exposition par instillation (Larcombe *et al.* 2014).

La taille des particules, présentes dans les gaz d'échappement de notre étude, est proche de celles émises par les véhicules diesel récents. Ces véhicules sont équipés de filtres à particules dont la porosité est de 400 nm or dans notre étude le diamètre des particules émises n'excédait pas 500 nm. Dans ces conditions d'exposition, nous nous rapprochons donc d'un gaz d'échappement de moteur diesel émis dans les conditions réelles.

Enfin, l'atout de cette étude est la production d'une deuxième génération afin d'observer les effets intergénérationnels d'une exposition gestationnelle de la génération Fo. D'autres études, menées au Brésil, exposant des souris à l'air pollué de Sao Paulo, ont démontré les effets d'une exposition sur 3 générations avec des expositions confondues en période pré-conceptionnelle, gestationnelle et post-natale, qui sont en effet plus proches de la réalité mais elles ne distinguent cependant pas les effets des différentes fenêtres d'exposition (Veras *et al.* 2008; Veras *et al.* 2009).

3.2.2. Limites

Dans notre étude, les lapines ont été exposées seulement pendant la gestation alors que les femmes sont exposées de façon continue. Les trois périodes (préconception, gestation et lactation) correspondent à des fenêtres importantes de susceptibilité dans le cadre de la programmation développementale. Néanmoins, les signes de retard de croissance (réduction de la longueur de la tête) à mi-gestation ainsi qu'à 28 jpc mis en évidence dans notre étude sont en accord avec les résultats obtenus dans les études épidémiologiques où une diminution de la circonférence de la tête et du poids du corps (non observé dans notre étude) a été démontrée au 2^{ème} et au 3^{ème} trimestre dans un contexte où les femmes sont exposés à la pollution à la fois en période pré-conceptionnelle et gestationnelle (Slama *et al.* 2009; Pedersen *et al.* 2013).

Les particules inhalées n'ont pas été caractérisées d'un point de vue physicochimique. Nous ne connaissons donc pas la nature chimique précise des particules inhalées par les lapines au cours de la gestation. Il a cependant été démontré que la nature chimique des particules et la composition de la corona ainsi que la taille des particules contrôlaient leur action biologiques et probablement les mécanismes de transfert cellulaire (voir **A§5.**) (Yamashita *et al.* 2011; Semmler-Behnke *et al.* 2014). La caractérisation de ces particules pourrait permettre d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes d'action des particules de diesel dans l'organisme des lapines. Néanmoins, nous savons que le cœur des particules diesel est formé de carbone et que leur surface est composée d'un mélange de composés organiques et inorganiques. De plus, nous savons que la corona protéique des nanoparticules va évoluer au sein de l'organisme orientant probablement leur action biologique et leur voie de dégradation. Des mécanismes de dégradation de ces particules peuvent être mis en place. Ainsi, les « *finger-print* » observés dans notre étude résulteraient de la dégradation de NP au sein des lysosomes en impliquant le métabolisme du fer (Levy *et al.* 2011).

L'exposition seulement aux gaz d'échappement de moteur diesel n'est pas non plus complètement représentative d'une exposition humaine à la pollution atmosphérique. Les gaz d'échappement de moteur diesel sont la source majeure de pollution mais ce n'est pas la seule, l'industrie, l'agriculture ou encore les feux à foyers ouverts sont d'autres sources majeures de production de particules. Même en se limitant aux gaz d'échappement, les nouveaux moteurs essences de deuxième génération avec une injection directe produiraient autant de particules que les moteurs diesel (Samaras *et al.* 2005). Il serait donc intéressant de pouvoir comparer les effets de l'inhalation de différents moteurs diesel et essence, ainsi que les nouvelles technologies permettant la réduction de l'émission des NO_x , des HAP, du CO et des particules, telle que la combustion en basse température ou les « biodiesel » (Imtenan *et al.* 2014).

Les effectifs des différents groupes d'étude restent faibles. Pour la première génération, les tests de puissance pour un t-test relatifs aux effectifs indiquent que pour la majorité des variables de biométrie, excepté les rapports des poids des organes sur le poids corporel, la puissance est supérieure à 80%. Pour la seconde génération, avec seulement trois femelles F1 gravides et 21 fœtus contrôles, la puissance relative aux effectifs n'est supérieure à 80% que pour 4 variables. Néanmoins, la puissance du modèle

linéaire après ajustement n'est pas calculable. Pour la deuxième génération, la puissance n'étant pas assez élevée, nous pourrions discuter le fait qu'avec des effectifs suffisants les effets observés pourraient être confirmés et complétés avec l'apparition de nouvelles variables significatives.







Figure D.4 | Photographie d'une coupe ultrafine d'un placenta de lapin à 28 jpc.

Sur la première image (**A**), nous pouvons observer la présence de grosses particules dans l'espace sanguin maternel (**B**) et dans le trophoblaste (**C**). Ces grosses particules ont été nommés « *finger-print* » et possèdent un diamètre variant de 200 à 400 nm.

4. Perspectives

Dans ce paragraphe sont présentées les expériences liées au projet EPAPP qui sont en cours ou programmées dans un futur proche.

4.1. Dosages

Grâce aux analyses en microscopie électronique (**Figure D.4**), nous avons émis l'hypothèse d'une dérégulation du métabolisme du fer dans les placentas au sein des particules nommées « *finger-print* » (Levy *et al.* 2011). Tout d'abord, nous avons donc cherché à quantifier la concentration en fer et autres métaux, ce qui pourrait permettre d'émettre des hypothèses quant à la composition de ces particules. Pour le dosage des métaux, nous avons envoyé quelques échantillons à Mohamed BENHAROUGA au CEA de Grenoble pour un test de détection des métaux. Au cours de ce test, le dosage du cuivre, du fer et du zinc a été réalisé sur des échantillons de plasma maternel Fo et fœtal F1 et de placentas F1. Ces trois métaux sont détectés dans nos tissus d'intérêt, les dosages sur un plus grand nombre d'échantillons sont prévus au cours de l'automne.

Les gaz d'échappement de moteur diesel sont composés d'une phase particulaire mais aussi d'une phase volatile qui contient plusieurs gaz toxiques et autres composés organiques volatiles comme les HAP. Nous avons donc cherché à quantifier la présence d'HAP et de leurs métabolites dans les différents liquides et tissus biologiques d'intérêt, c'est-à-dire les plasmas maternels et fœtaux et les placentas. Pour cela, des pools de plasma contrôles et exposés ont été envoyés à Jean-Philippe ANTIGNAC du LABERCA (Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments) à Nantes. Avec la méthode de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS), aucun HAP n'a pu être détecté au-delà des seuils de détection, leurs métabolites n'étant pas dosés. Par la suite, nous avons pu échanger avec Nathalie GROVA et Brice APPENZELLER du LIH (*Luxembourg Institute of Health*) qui ont développé une technique plus sensible de GC-MS chez le rat (Grova *et al.* 2011). Nous sommes en contact avec ces personnes afin de trouver les financements nécessaires pour mettre au point le dosage sur des échantillons de plasma, liquide amniotique et placenta et de réaliser les dosages sur un plus grand nombre d'échantillons par la suite.

4.2. Caractérisation des nanoparticules

Nous avons cherché à caractériser les particules observées en microscopie électronique dans les poumons et les placentas. Pour cela, Josiane AIOUN et Anne TARRADE ont réalisé des tests en spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX). Cette technique combinée à la microscopie à transmission permet l'analyse élémentaire sur des surfaces nanométriques. L'impact du faisceau d'électrons sur l'échantillon produit des rayons X qui sont caractéristiques des éléments présents sur l'échantillon. Cette technique pourrait permettre d'analyser la composition chimique élémentaire des particules, cependant cela implique que la structure à analyser soit de taille suffisante. Seules les plus grosses particules, ici les « *finger-print* » (200 à 500 nm de diamètre), ont permis de détecter un signal. Le deuxième problème est inhérent à la technique d'inclusion des échantillons. En effet, elle nécessite l'utilisation de ferricyanure de potassium qui interfère dans les analyses par son apport en fer, mesuré par l'EDX.

Une caractérisation des particules avant l'inhalation nous aurait permis d'avoir un repère pour l'analyse chimique des tissus biologiques prélevés. Cette caractérisation n'a cependant pas été réalisée, rendant difficile les possibilités d'analyse des particules observés dans les tissus.

4.3. Epigénétique

Nous avons choisi d'analyser la méthylation de l'ADN dans les placentas F1 car la mise en place de marques épigénétiques pourrait apporter des éléments de discussion et d'explication des effets observés dans les deux générations (Daxinger & Whitelaw 2012). Cette partie du projet a fait l'objet du post-doctorat d'Hala AL ADHAMI.

L'absence de données sur la méthylation de l'ADN placentaire chez le lapin et l'amélioration constante de l'annotation du génome lapin (Carneiro *et al.* 2014) nous ont poussées à mettre en place ces analyses dans notre étude. Plusieurs études ont démontré des perturbations des marques épigénétiques suite à une exposition à la pollution atmosphérique (Wilhelm-Benartzi *et al.* 2012; Janssen *et al.* 2013).

Tout d'abord, nous avons fait le choix d'une approche pan génomique sans à priori en combinant les données de deux méthodes d'analyse : le MeDIP-Seq (*Methylated DNA ImmunoPrecipitation sequencing*) et le RRBS (*Reduced Representation of Bisulfite Sequencing*). Ces deux approches donnent des informations complémentaires. Par



Figure D.5 | Classification hiérarchique en distance euclidienne de la méthylation globale.

« TFP »: 1^{ère} lettre représente le groupe (T: Témoin et P: Pollué/Exposé), la 2^{ème} lettre représente le sexe (M: Mâle et F: Femelle) et la 3^{ème} lettre représente le tissu (P: Placenta/Zone labyrinthique et D: Décidue).

La méthylation globale des placentas (P) et des décidus (D) a été analysée. La classification hiérarchique permet une séparation selon les tissus. Au sein de chaque tissu, les 4 groupes représentent les mâles (M) et les femelles (F), témoins (T) et pollués/exposés (P). La classification hiérarchique permet de distinguer une séparation entre les pollués et les témoins de façon équivalente dans les deux tissus.

MeDIP-Seq, des régions méthylées d'ADN génomique sont immunoprécipitées avec un anticorps spécifique et identifiées par séquençage. Il est ainsi possible d'identifier des DMR (*Differentially Methylated Regions*) entre deux conditions. Le RRBS est la combinaison d'un clivage enzymatique, d'une sélection des fragments en fonction de leur taille, d'une conversion par le bisulfite de sodium (transforme une information épigénétique (C/5meC) en polymorphisme de séquence T/C) et d'un séquençage. Cette technique fournit une information de taux de méthylation à la base près, pour une partie du génome représentative des régions régulatrices et des ilots CpG. Il est donc identifié d'une part des DMC (*Differentially Methylated Cytosine*) entre deux conditions, qui peuvent ensuite être associés en DMR.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'analyser des échantillons avec des phénotypes « extrêmes » (RCIU/témoin) de façon à pouvoir déterminer une liste de DMR qui pouvait être transformée par la suite en liste de gènes candidats à analyser sur la totalité des échantillons. La sélection des échantillons a conduit à 8 groupes distincts : Témoin/RCIU, zone labyrinthique (ZL)/décidue, mâles/femelles. A la suite des analyses par RRBS, il a été possible d'utiliser 2,6 millions de CpG afin d'établir une classification hiérarchique en distance euclidienne basée sur le différentiel de méthylation entre échantillons (**Figure D.5**). La **Figure D.5** montre qu'il est possible de distinguer deux groupes correspondant chacun à l'un des tissus (ZL et Décidue) et signant des régions différentiellement méthylées en fonction du tissu. Au sein de chaque tissu, il est aussi possible de distinguer le groupe pollué du groupe témoin. A noter aussi que seulement dans le groupe témoin, il y a une différence entre les mâles et les femelles, différence observée dans les deux tissus. Cette analyse souligne donc une réponse sexe-spécifique à l'exposition maternelle.

De ces premières analyses, nous allons sélectionner des DMR et cibler les promoteurs de gènes qui nous paraissent les plus pertinents (e.g., gènes soumis à empreinte, transporteurs placentaires, gènes liés au stress oxydatif) et nous validerons ce différentiel par une autre technique, le Bisulfite-Pyroséquençage en utilisant l'ensemble des échantillons individuellement.

Par ailleurs, il a été décidé de se focaliser sur la zone labyrinthique en analysant les 40 échantillons (sélectionnés pour la transcriptomique) individuellement par RRBS, afin d'explorer de manière individuelle toutes les variabilités de la méthylation de l'ADN

placentaire en réponse au stress d'exposition maternelle. L'objectif est d'établir une cartographie de la méthylation de l'unité placentaire qui pourra être superposée aux analyses transcriptomiques et GSEA. Une intégration de l'ensemble des données devrait fournir une meilleure compréhension de la coordination de la réponse adaptative de l'unité placentaire en fonction du sexe du fœtus.

4.4. Projet Brain AirPoll

Le projet Brain AirPoll (Figure D.3) fait l'objet de la thèse d'Estefania BERNAL-MELENDEZ encadrée par Henry SCHROEDER et Christine BALY. Cette thèse traite des effets de l'exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel sur le développement cérébral et olfactif ainsi que sur le comportement des individus après la naissance. A 28 jpc, des anomalies structurales (diverses colorations histologiques) et fonctionnelles (HPLC pour *high performance liquid chromatography*) ont été observées dans les tissus olfactifs. Les analyses en microscopie électronique ont mis en évidence la présence de particules dans la muqueuse et les bulbes olfactifs. A l'âge de 2 jpn chez les descendants F1 exposés *in utero*, des altérations de perception de la phéromone mammaire ont été observées dans le groupe exposé. Les analyses sont en cours sur les individus F1 adultes et les descendants F2. L'analyse plus approfondie des réseaux de gènes réprimés dans les placentas F2 concernant l'olfaction et la transduction du signal neuronal sera à mettre en relation avec les résultats obtenus dans ce projet.

4.5. Métagénome intestinal

En collaboration avec Joël DORE de l'unité MICALIS (Microbiologie de l'alimentation au service de la santé) et Olivier ZEMB de l'INRA de Toulouse, nous souhaitons analyser le métagénome intestinal des femelles Fo ainsi que de leurs descendants à l'âge adulte. Au cours de la grossesse, le microbiome s'adapte aux exigences métaboliques accrues du fœtus en développement (Astbury *et al.* 2015), nous pourrions donc imaginer qu'une dérégulation du microbiome des lapines gravides pourrait avoir un effet délétère sur l'apport de nutriments aux fœtus. De plus, les facteurs environnementaux auxquels les fœtus sont exposés au cours de leur développement peuvent influencer la maturité de l'intestin (Groer *et al.* 2015). Les premiers résultats de ces analyses métagénomiques devraient être disponibles au cours du mois d'Octobre.

5. Impact sociétal

Ces travaux doivent être confirmés par d'autres études mais ils soulèvent la question de la place de la femme enceinte dans les messages d'alertes aux pics de pollution dans les grandes villes européennes. De plus, dans les recommandations de l'OMS, les nanoparticules, avec un diamètre inférieur à 100 nm, ne sont soumises à aucun seuil d'information ou d'alerte. D'après nos résultats, il serait peut-être important de mesurer les concentrations en nanoparticules et de les soumettre à des réglementations et des objectifs de qualité.

Se pose aussi la question de l'évolution des technologies avec la miniaturisation et l'apparition des nanoparticules, non seulement dans les gaz d'échappement mais en tant que composés ou vecteurs dans un grand nombre d'aliments ou objets manipulés au quotidien. Les filtres à particules présents dans les moteurs diesel limitent l'émission d'une partie des particules, mais ne faudrait-il pas revoir leur composition et leur porosité afin de limiter de manière plus importante encore les émissions de particules ultrafines.

Les normes européennes (normes EURO) pour les cycles d'homologation des véhicules pour une mise sur le marché évoluent. Les concentrations en gaz toxiques et particules sont régulièrement revues à la baisse, cependant les particules sont considérées comme une totalité de particules émises et elles ne sont pas catégorisées en fonction de leur taille. L'Europe, le Japon et d'autres pays utilisant principalement le cycle d'homologation européen travaillent sur l'harmonisation mondiale des cycles d'homologations, peut-être faudrait-il que les concentrations de particules émises soient mesurées de manière plus précise afin de limiter l'émission de particules de plus en plus fines.

En conclusion, cette étude a ouvert la voie à la remise en question de la place de la femme enceinte dans les messages d'alerte mais aussi de la prise en compte de la nocivité des nanoparticules émises par les moteurs diesel.

Partie E

Conclusion

Partie E : Conclusion

Les femmes enceintes doivent-elles être considérées comme personnes sensibles dans les messages d'alerte en cas de pics de pollution dans les grandes villes européennes ? Les études épidémiologiques commencent à répondre à cette question en démontrant les effets délétères d'une exposition maternelle à la pollution atmosphérique sur le développement fœto-placentaire et sur le développement de pathologies neurologiques, respiratoires et cardiovasculaires chez les descendants. Des modèles animaux mis en place pour comprendre les mécanismes d'actions des différentes molécules toxiques de la pollution atmosphérique ne permettent pas de tirer de réelles conclusions car leur comparaison est trop complexe en raison de la grande diversité des techniques, des concentrations, des périodes et des temps d'exposition, ne reflétant pas forcément l'exposition humaine (inhalation et sources de pollution diverses).

L'objectif de notre étude était de se rapprocher des conditions d'exposition des femmes enceintes, de par le choix de la technique d'inhalation, du modèle lapin ou encore de la concentration en particules inhalées.

Nous avons pu démontrer que non seulement l'exposition gestationnelle aux gaz d'échappement de moteur diesel entrainait des défauts de vascularisation placentaire provoquant des défauts de croissance fœto-placentaire, telle que la réduction de la longueur de la tête et de l'efficacité placentaire. Nous avons aussi mis en évidence que les particules de diesel inhalées étaient capables de traverser le placenta. Enfin, nous avons démontré que cette exposition programmait des dérégulations métaboliques jusqu'en deuxième génération.

L'exposition gestationnelle aux gaz d'échappement de moteur diesel entraine des perturbations des environnements intra-utérin et post-natal précoce (lactation) des fœtus F1, ce qui programme l'apparition de composants du syndrome métabolique chez les mâles F1 adultes et des dérégulations du métabolisme énergétique et osseux chez les femelles F1 adultes. Le phénotype des femelles F1 adultes induit des perturbations du métabolisme lipidique et du cholestérol chez les fœtus F2, suggérant des effets indirects de l'exposition gestationnelle des lapines F0.

Ces travaux alertent sur la nocivité des gaz d'échappement chez la femme enceinte et le fœtus en développement. De plus, ils apportent des éléments de réponse sur la toxicité des nanoparticules présentes dans les gaz d'échappement de moteur diesel. Cependant, les mécanismes précis d'action et de transfert transplacentaire de ces nanoparticules diesel restent encore à approfondir.

Annexes

Annexe 1: A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles.

Hougaard K., Campagnolo L., Chavatte-Palmer P., Tarrade Anne, Rousseau-Ralliard D., <u>Valentino S.</u>, Park M.V.D.Z, de Jong W.H., Wolterink G., Piersma A.H., Ross B.L., Hutchison G.R., Stilund Hansen J., Vogel U., Jackson P., Slama R., Pietroiusti A., Cassee F.R.

http://dx.doi.org/10.2016/j.reprotox.2015.05.015
Reproductive Toxicology 56 (2015) 118-140

Contents lists available at ScienceDirect



Reproductive Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/reprotox

A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles

CrossMark

Reproductive Toxicology

Karin Sørig Hougaard^{a,*}, Luisa Campagnolo^b, Pascale Chavatte-Palmer^{c,d}, Anne Tarrade^{c,d}, Delphine Rousseau-Ralliard^{c,d}, Sarah Valentino^{c,d}, Margriet V.D.Z. Park^e, Wim H. de Jong^e, Gerrit Wolterink^e, Aldert H. Piersma^{e,j}, Bryony L. Ross^f, Gary R. Hutchison^g, Jitka Stilund Hansen^a, Ulla Vogel^{a,h}, Petra Jackson^a, Rémy Slamaⁱ, Antonio Pietroiusti^b, Flemming R. Cassee^{e,j}

^a National Research Centre for the Working Environment, Copenhagen, Denmark

^j Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history: Received 13 March 2015 Received in revised form 18 May 2015 Accepted 26 May 2015 Available online 4 June 2015

Keywords: Nanoparticles Nanomaterial Ultrafine particles Developmental toxicity Reproductive toxicity Inhalation Instillation Pregnancy

$A \hspace{0.1in} B \hspace{0.1in} S \hspace{0.1in} T \hspace{0.1in} R \hspace{0.1in} A \hspace{0.1in} C \hspace{0.1in} T$

This paper aimed to clarify whether maternal inhalation of engineered nanoparticles (NP) may constitute a hazard to pregnancy and fetal development, primarily based on experimental animal studies of NP and air pollution particles. Overall, it is plausible that NP may translocate from the respiratory tract to the placenta and fetus, but also that adverse effects may occur secondarily to maternal inflammatory responses. The limited database describes several organ systems in the offspring to be potentially sensitive to maternal inhalation of particles, but large uncertainties exist about the implications for embryo–fetal development and health later in life. Clearly, the potential for hazard remains to be characterized. Considering the increased production and application of nanomaterials and related consumer products a testing strategy for NP should be established. Due to large gaps in data, significant amounts of groundwork are warranted for a testing strategy to be established on a sound scientific basis.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Abbreviations: Au, gold; Ag, silver; Cd, cadmium; CdTe, quantum dots coated with mercaptopropionic coating; CNS, cerebral nervous system; CNT, carbon nanotubes; DA, dopamine; DE, diesel exhaust; DEP, diesel exhaust particles; DSP, daily sperm production; ECHA, European Chemicals Agency; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ESTR, expanded simple tandem repeat; EU, European Union; FDA, Food and Drug Administration; GD, gestational day; GI, gastrointestinal; IL, interleukin; IV, intravenous; MWCNT, multiwalled carbon nanotubes; NCTR, National Center for Toxicological Research; NIOSH, National Institute of Occupational Safety and Health; NM, nanomaterials; NP, nanoparticles; OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; PEG, polyethyleneglycol; PM, particulate matter; QDs, quantum dots; REACH, Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals; ROS, reactive oxygen species; Se, selenium; SO₂, sulfur dioxide; SWCNT, singlewalled carbon nanotubes; TEM, transmission electron microscopy; TiO₂, titanium dioxide; ZnO, zinc oxide.

* Corresponding author at: National Research Centre for the Working Environment, Lersø Parkallé 105, DK-2100 Copenhagen, Denmark. Tel.: +45 39 16 52 00; fax: +45 39 16 52 01.

E-mail address: ksh@nrcwe.dk (K.S. Hougaard).

http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.015

0890-6238/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4. 0/).

^b University of Tor Vergata, Dept. Biomedicine and Prevention, Rome, Italy

^c INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy-en-Josas, France

^d Fondation PremUp, Paris, France

^e National Institute for Public Health and the Environment RIVM, Bilthoven, The Netherlands

^f Institute of Occupational Medicine, Edinburgh, Scotland, UK

^g Edinburgh Napier University, Edinburgh, Scotland, UK

^h Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark

¹ Inserm and Univ. Grenoble-Alpes, Team of Environmental Epidemiology applied to Reproduction and Respiratory Health, Grenoble, France

1. Introduction

Nanotechnologies are among the fastest growing research areas, with promises of immense benefits within many imaginable applications and industries, from health care to crop protection and consumer products. A large number of nano-containing products are already available and their global market is expected to exceed several billion euros annually [1].

Increasing implementation of nano-based applications enhances the likelihood of human exposure to the products of nanotechnology and to nanoparticles (NP) themselves. This has led to concerns about the ensuing potential risks to human health. Of the many types of nanomaterials (NM), mainly the nano-sized particles are suggested to pose a risk to humans. Engineered NMs are intentionally designed and manufactured materials having novel properties due to their nanoscale size in one or more dimensions [2]. Engineering of nanoparticles provides NM with new properties borne from the ability to design and control the atomic structure, shape and surfaces (e.g., by use of coatings). Thus, the physical and chemical properties of NMs may be fundamentally different from that of their larger sized counterparts (generally designated the bulk material). These same novel properties that confer the desired material attributes for functional applications, also fuel an expectation that the biological effects of NMs will be different from those of the corresponding bulk material (and perhaps even be more severe) [1]. It follows that the toxicological properties may change in the aftermath of nano-engineering, and that this may limit or even prevent the extrapolation of bulk toxicological evaluations to NP of the same material, by default.

It is broadly accepted that the fetus may be more sensitive to chemical exposures than the adult organism [3]. Still, the database on developmental toxicity of engineered NP is to date very limited and remains insufficient as a basis for risk assessment for pregnant women and their children [4,5]. Furthermore, it is a prevalent conception that as long as translocation of NMs from the port of entry to the fetus is not indicated, fetal effects are considered unlikely [6]. In the occupational setting, and for many consumer products with spray applications, inhalation will be the primary route of exposure, leading to deposition of particles in the lung. For particles to reach the fetus, they need first to translocate at the portal of entry, in this case from the lung to the systemic circulation, and then to traverse the additional barrier of the placenta [7]. However, particles may not need to reach the fetus to affect development [8]. Many particles elicit inflammation and oxidative stress in the lungs [9-11]. Specifically, during pregnancy, inflammation and oxidative stress induce perturbations that have been shown to have detrimental and longlasting consequences for fetal development [12,13]. Furthermore, inflammatory mediators are biologically active molecules that may trigger a range of responses in the tissues they reach. Inflammation elicited in the lung may potentially alter neuroendocrine regulation of maternal hormonal systems [14]. Fetal development of most organs depends on tight hormonal control for optimal function in the life after birth. Disruption of the maternal hormonal balance during pregnancy may therefore have consequences for fetal and postnatal development [15].

The lack of knowledge and attention to this area is all the more alarming as the few published studies within this field do actually indicate that maternal exposure to NMs may be able to adversely affect pregnancy, interfere with fetal development, and have consequences for the offspring later in life (reviewed in [4,8,16]). That potential developmental toxicity has received little attention seems particularly odd in the view of emerging recognition of health effects by exposure to ambient air pollution and the role that ultrafine particles (i.e., particles with dimensions toward the nanoscale) may play [17–20]. To summarize the state of knowledge and provide a basis for risk assessment of airborne NP in the work environment and in consumer products, this review aims to:

- 1. Clarify whether maternal inhalation of engineered NP may constitute a hazard to pregnancy and development of the fetus.
- 2. Identify fetal organ systems that might be sensitive to maternal inhalation exposure and therefore warrant further scrutiny, based on experimental studies.
- 3. Outline recommendations for future testing strategies.

To achieve these aims, the review will first describe the evidence for developmental toxicity for airborne NP. This information will subsequently be combined with data from developmental toxicity studies of NP using other routes of exposure, of ambient air pollution using total inhalable particulate matter as well as combustion derived particles from diesel engine exhaust, as well as data from epidemiological studies of ambient, particulate air pollution.

2. Developmental toxicity testing requirements for nanomaterials

The European Commission recommended in 2011 that nanomaterials were defined as a natural, incidental or manufactured material where more than 50% of the particles had one or more dimensions in the size range of 1–100 nm [21]. For regulatory toxicity testing, NM are currently evaluated similarly to the corresponding bulk chemical. The European Union (EU) states that the current risk assessment methods are applicable for risk assessment of NM, even if work on particular aspects of risk assessment is still required. Nanomaterials are therefore regulated by the EU chemical safety regulation for the Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals (REACH) and the regulation for Classification, Labelling & Packaging (CLP). Thus, NM are defined as a "chemical substance" in both regulations and general obligations for NM are similar to those for any other substance. Although the European Commission considers that REACH sets the best possible framework for the risk management of NM when they occur as substances or mixtures, more specific requirements for NM within the framework probably prove necessary. The Commission also foresees an impact assessment of relevant regulatory options, in particular possible amendments of the REACH Annexes, to ensure further clarity on how nanomaterials should be addressed and their safety demonstrated in registration dossiers [22].

In Europe, testing of reproductive and developmental toxicity of NM is therefore triggered in REACH when the chemical under consideration has a production volume of 10 tons per year or more, irrespective of its content of nanosized particles [23]. The REACH Implementation Projects on Nanomaterials (RIP-oN-2) identified reproductive toxicity as an endpoint for which "no important differences between NM and non-NM are suspected in terms of the applicability of the standard test guideline methods, but for which an insufficient evidence basis exists to warrant acknowledgment in the guidance" [24,25]. Further research and development was considered required, in particular with regard to the value of in vitro testing by the embryonic stem cell test, the micromass embryotoxicity assay, and the whole rat embryo culture. For repeated dose toxicity, it was recommended to include inhalation as a route of exposure and to combine this study with a reproductive toxicity screening study, e.g., the OECD testing guideline 422 [26], which is also recommended by REACH at the tonnage level of 10 tons/year or more for conventional chemicals. Furthermore, the RIP-oN2 report stated that the use of in silico approaches such as (Q)SAR, groupings and read across for reproductive and developmental toxicity are not sufficiently developed for NM [24]. These recommendations

Table 1

OECD	guidelines	for toxicity	testing of	f develoi	omental	toxicity.
	0					

OECD guideline number	Brief description
OECD 421	Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
OECD 422	Combined Repeated Dose Toxicity Study with the
	Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
0ECD 414	Prenatal Development Toxicity Study
OECD 416	Two-Generation Reproduction Toxicity
0ECD 443	Extended One Generation Reproductive Toxicity Study
OECD 426	Developmental Neurotoxicity Study. This test is
	harmonized with the US-EPA developmental neurotoxicity
	guideline but includes a number of refinements, such as a
	longer postnatal exposure period

have been reproduced by the European Chemicals Agency (ECHA) in their Guidance on information requirements and chemical safety assessment for NM [25].

In the USA, the National Institute of Occupational Health and Safety (NIOSH) recommends investigation of the potential for developmental and reproductive effects by NM, in the National Occupational Research Agenda by NIOSH's Reproductive Health Research Team. This is because it is theoretically possible that NP may cross the placenta [27]. The regulatory testing requirements of the US Food and Drug Administration (FDA) vary between the product-categories that are regulated by the Agency. In 2014, the FDA issued a number of guidance documents for industry, for safety of NM in cosmetic products and use of NM in food for animals [28]. Similar to the EU, the FDA generally considers the current framework for safety assessment of chemicals sufficiently robust and flexible to cover NM. Nevertheless, one of the focal points of FDA's nanotechnology regulatory science research portfolio is the adequacy of current testing approaches for assessment of safety, effectiveness, and quality of products containing NM. Furthermore, regulatory science research on nanotechnology in FDA's National Center for Toxicological Research (NCTR) aims to develop guidelines for the safe and effective use of NM in drugs, devices, foods, cosmetics, and dietary components. It is not stated whether specific emphasis is placed on reproductive and developmental toxicity [29]

Generally, international regulatory risk assessment frameworks for industrial chemicals, pesticides, and biocides make use of OECD guidelines for toxicity testing. The following testing guidelines for developmental and reproductive toxicity testing are accepted as test guidelines for use in the REACH framework (Table 1).

The OECD's Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN) was established in 2006 and currently evaluates, and where necessary modifies, existing guidelines for their applicability to testing of NM, such as guidance on genotoxicity testing [30]. To our knowledge, there are no specific activities on evaluating guidelines for testing of developmental and reproductive toxicity relative to testing of NM.

In short, the existing regulatory testing requirements and guidelines for developmental and reproductive toxicity testing developed for chemical safety assessment are generally assumed to be adequate for NM. The limited availability of data to support this assumption is, however, recognized. A recent gap analysis undertaken as part of the ITS-NANO EU Framework 7 project on the hazard of NM clearly highlighted the lack of information on potential reproductive and developmental effects of NM [31]. Furthermore, the project recommended investigation into the value of some alternative tests for their putative application as screening tools or even as partial replacements for in vivo developmental tests in the testing of NM. An interesting point for consideration is that grouping and read-across approaches under REACH are extremely complex and generally considered insufficiently developed for NM.

[32]. This implies that each and every variation of a nanomaterial should be evaluated separately with regard to their potential reproductive and developmental effects, potentially resulting in the requirement of numerous animal studies. In view of efficiency and cost, and since reproductive and developmental studies already are responsible for the majority of animal use for regulatory safety testing for REACH [33], there is a clear need for development of alternative testing strategies.

3. Toxicokinetics of maternal NM exposure relative to fetal effects

A key issue in assessment of potential risks for developmental toxicity by NMs is the possibility for fetal exposure, due to migration of particles into the uterus and the fetus. To affect the fetus directly, the nanomaterial should first become systemically available and subsequently cross the placenta, unless particles are already present in maternal tissues upon implantation or exposure takes place early in pregnancy. Indirect effects may however be relevant for maternal inhalation exposure, and may to some degree be independent of the systemic availability, as will be discussed later.

3.1. Overall toxicokinetic pattern of inhaled particles

In the lung, uptake of particles occurs in the alveoli and depends on the deposition of the particles. Particles with a diameter from 1 to 100 nm show a much higher fraction of deposition in the pulmonary region of the lung compared to larger particles [34,35]. For particulates, uptake into the systemic circulation is limited and often amounts to less than a few percent of the total dose for most routes of exposure [36,37]. This challenges study of transfer across first the lung barrier and secondly the placenta, as most methods for detection are not able to detect and quantify small amounts of particles in the tissue. This obviously hampers detection of a slight transfer of particles into small amounts of tissue, as in the fetus. The limit of detection for a commonly utilized measurement technique of (metal) oxide NP, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy (ICP-MS), is in the order of 50 ng/g tissue for TiO₂ NP [38]. However, this may be relatively high compared to the limited nanoparticle translocation across the lung membrane and thus the minute amounts that may potentially reach the tissues of both mother and/or fetus. Studies of tissue distribution and placental transfer have therefore mainly used the intravenous route (IV) of administration [39–41] rather than inhalation exposure. Intravenous administration furthermore allows for control of the systemically available dose thus easing identification of potential target organs as well as their relative importance.

It must be taken into account that results may not be directly extrapolated from IV administration to inhalation exposure. This is because the systemic distribution pattern may depend on the route of administration, as had been shown for a comparison of IV versus intratracheal (deposition directly in the lung) administration of gold-NP [36,42,43]. This is probably because NP are spontaneously coated with a range of different proteins when they come into contact with biological media; this is commonly referred to as the "protein corona" [44,45]. As different protein coronae may arise when particles come into contact with bronchioalveolar fluid compared to plasma, differences in coronal composition relative to the route of exposure might determine the overall distribution patterns [43].

The surface composition of NP has a tremendous influence on their behavior in vivo. PEGylation (covalent attachment of polyethylene glycol polymer chains to the NP) is known to increase the circulation time of NP in blood [46]. The surface composition has also been found to affect accumulation of Au NP in fetuses of



Fig. 1. Schematic representation of the anatomical characteristics of the different types of placentation in mammals. (A) Pigs and (B) Ruminants (sheep): the placenta is either diffuse (A) or cotyledonary (B), i.e., organized into 70–100 separate entities named placentomes. There is no or very little trophoblastic invasion, respectively. Materno–fetal exchange occurs through 6 cellular layers (maternal endothelium, mesenchyme and epithelium, trophoblast, mesenchyme and fetal vascular endothelium). (C) Primates, rodents and lagomorphs (rabbits): the placenta invades the endometrium and destroys the maternal endothelium, thereby creating lacunae where the trophoblast is in direct contact with the maternal blood. In mice, the trophoblast consists of three cell layers (hemotrichorial placentation) whereas only two trophoblastic cell layers persist at term in primates and lagomorphs (syncytiotrophoblast and cytotrophoblast, the latter being discontinuous in late gestation; hemodichorial placenta; U: uterus; UC: umbilical cord; YS: yolk sac.

mice. Thus, NP accumulation in the fetal tissues was observed prior to gestation day (GD) 11.5 after intravenous injection to the dams of gold NP (Au-NP) coated with ferritin, citrate or PEG in a saline solution. A much larger transfer of ferritin-coated and PEGylated NP compared to citrate-coated NP was observed, demonstrating the importance of surface modifications. Although no NM were found in the fetus after 11.5 days of gestation, the accumulation of Au-NP in the extra-embryonic tissues increased substantially thereafter [47]. The study indicates the presence of a time window for nanoparticle placental transfer of 13 nm Au-NP between GD 9.5 and GD 11.5 that coincides with maturation of the murine placental blood supply and barrier function of the placenta at around E10.

After IV administration of NP to adult animals, most particles end up in liver and spleen. Both organs belong to the mononuclear phagocytic system which has a major function in removing foreign agents from the circulation. Very small NP may have a more widespread tissue distribution than larger NP as was demonstrated for Au-NP. The quantity of particles in other organs typically account for a relatively low (0.1–0.2%) percentage of the injected dose expressed as mass, although in absolute terms the number of particles may be quite high (10¹⁰ per gram tissue) [39].

The evidence for widespread organ distribution of NP following various routes of exposure seems limited. It can, however, not be excluded that NP reach the uterus. Indeed, low levels of Au-NPs (<0.2% of the administered dose in mass) were observed in the uterus after both intratracheal and intravenous administration of 1.4 nm and 18 nm Au-NPs [43]. Endocrine, vascular, inflammatory or oxidative stress may impair the placental barrier function, thus indirectly allowing more placental passage and induction of adverse fetal effects.

3.2. Transplacental transfer

Placentation differs between species. Thus, in order to compare available data on transplacental transfer of NP to the fetus, it is necessary to understand the anatomical and physiological differences in placentation between humans and the model animal species most commonly used to study developmental toxicology.

The placenta constitutes the complex interface between the inner mucous membrane of the uterus (endometrium) and the fetus, and ensures feto-maternal exchanges, but also has endocrine and immunological functions. It is formed after implantation of the conceptus, from the outer cell layer of the blastocyst (the trophoblast) and is therefore of embryonic origin [48]. Various forms of placentation are found in mammals (Fig. 1). Their differences with respect to morphology, cellular organization and structural separation of maternal and fetal blood may deeply affect transplacental transfer of NM between model species [49,50]. Placental structure and endocrine function evolve throughout gestation [51]. Furthermore, placental permeability to NM depends on the gestational stage. Human placentation is hemochorial, denoting that the trophoblast is in direct contact with the maternal blood. At GD 21, the human trophoblast starts formation of villi that invade deeply into the uterine wall to reach the maternal arteries (Fig. 2). Direct contact with maternal blood occurs at the end of the first trimester, when trophoblastic plugs in the spiral arteries are destroyed enabling maternal blood to flow into the intervillous chamber (reviewed in [52]). Primates, rodents and lagomorphs (rabbits) also possess a hemochorial placenta. In the murine model, trophoblastic invasion starts on GD 13 and completes at GD 15-18, i.e., only a few days before birth on GD 19-20. Thus, invasion is very limited compared to humans [53]. In rats, invasion occurs between 15 and 18 days of pregnancy and is far more similar to the human situation [54]. Other animal species, such as the sheep and pig, possess an epitheliochorial placenta, where the placenta is apposed to the maternal endometrium, with no trophoblastic invasion or fusion of the 6 maternal and fetal membranes, although there are extensive increases in interdigitation and thinning of the 6 maternal and fetal cell layers during the course of gestation [49,50,52] Fig. 1. It is apparent that the susceptibility to developmental effects



Fig. 2. Schematic representation of the anatomical and cellular structure of the human placenta. (A) Anchored fetal villi showing the extravillous trophoblast reaching the uterine spiral artery to form plugs in the first trimester. The extravillous trophoblast lines and remodels the uterine spiral artery to allow free flow of maternal blood into the intervillous chamber [193]. (B) Transversal section of the fetal villi illustrating the hemodichorial structure of the human placenta where only two layers (syncytiotrophoblast and the cytotrophoblast) separate maternal and fetal blood in the first and (C) third trimester, where even the cytotrophoblast becomes discontinuous. CT: cytotrophoblast; eEVCT: endovascular extravillous cytotrophoblast; DC: decidual cells; FV: fetal vessel; GC: Giant cells; iEVCT: invasive extravillous cytotrophoblast; IC: intervillous chamber; M: mesenchyme; MSA: maternal spiral artery; pEVCT: proliferative extravillous cytotrophoblast; ST: Syncytiotrophoblast; UV: uterine vein; VCT: villous cytotrophoblast.

of inhaled NMs may change according to the gestational time of exposure as both the embryo and the placenta undergo striking anatomical and functional changes during pregnancy. Placental permeability increases as gestation progresses. In this respect, biochemical mediators released into the maternal systemic circulation may reach and damage the embryo at some stages of pregnancy, but not at others [55].

3.2.1. In vitro models of the placenta

These are simplified in vitro cell culture models that can be used in the study of transplacental transfer of NP. One of these is the in vitro Transwell[®] insert model in which a membrane separates two liquid compartments. Cells can be grown on both sides of the membrane (e.g., epithelial and endothelial cells to mimic blood vessels). Transport via the cells and membrane can be measured by adding the substrate in the top compartment and measure passage to the other low compartment. The transport of particles over the in vitro Transwell® insert model seeded with a trophoblastic cell line was demonstrated to be size-dependent, showing a higher transport rate for 50 nm compared to 100 nm fluorescent polystyrene NP over a period of 24 hours (3.5% and 0.6%, respectively) [56]. For poly-L-lactide-co-glycolic acid NP used as a drug carrier for dexamethasone, a size-dependent crossing of the placental Transwell membrane model was also shown for 146 nm compared to 232 nm particles [57].

3.2.2. Human placental perfusion models

Further information on placental transfer of NP may be gained from the human placental perfusion model. The model mimics the maternal and fetal blood circulation in the placenta by perfusing a single cotyledon, excised from the placenta ex vivo. When particles are added to the perfusate at the maternal side of the cotyledon, measurement of the particular particle in the fetal perfusate allows for study of transfer across the placenta. For 25 nm and 50 nm silica NP, the transport into the fetal compartment in the human placenta model was 4.2% and 4.6% of the internal maternal concentration, respectively [58]. A substantial decrease in NP concentration was

drance [59].

3.2.3. Animal models

Animals allow for study of placental transfer in vivo, in intact biological systems. As indicated above, the low uptake from the lung and limited transfer across the placenta combined with too high limits of detection restrains the determination of NP in fetal tissues. Therefore, most studies of placental transfer have applied the IV route of administration rather than inhalation, usually following a single IV injection of the dam. By varying the day of administration relative to the conception the changes in particle transfer during gestation can be evaluated. In pregnant rats, the intravenous administration of ¹⁴C(C60) fullerenes resulted in transfer into the placenta (2.21% of the injected dose) and fetuses (0.87% of the injected dose) [60]. When administered IV to lactating dams on postnatal day (PND) 9, the presence of ¹⁴C in the GItract and liver of the pups (2.7-4.3% and 0.05-0.06% of the injected dose, respectively) demonstrated that ¹⁴C(C60) fullerenes reached the pups via the milk. ⁹⁹Technecium-labeled multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) were intravenously injected into pregnant mice at approximately GD 17 [61]. After 24 h, the highest quantity of MWCNT was observed in the lung followed by the liver, in both the mother and fetuses. In the fetus the quantity of ⁹⁹Technecium was approximately 1% of the injected dose.

noted in the maternal perfusate without a corresponding increase

in the fetal perfusate, indicating that NPs accumulated in the pla-

cental tissue. Fluorescent polystyrene beads of a diameter up to 240 nm at a concentration of $25 \,\mu$ g/mL in fluid on the maternal

compartment could cross the placental barrier almost without hin-

In pregnant mice, a single intravenous injection of quantum dots consisting of a cadmium–tellurium (CdTe) core with an outer layer of mercaptopropionic acid between GD 20 and 22, led to a size- and dose-dependent accumulation, measured as Cd, in the pups indicating placental transfer of 0.23–0.61% of the injected dose, with higher dosages showing a reduced actual transfer to the fetuses [62]. Inhalation of 11–15 nm cadmium oxide NP from GD 4.5 to day



Fig. 3. Mechanistic pathways in developmental toxicity of NP. NP may potentially affect embryonic/fetal development via direct as well as indirect mechanisms. Indirect effects may arise if inhaled NP deposit in the maternal alveoli and here generate reactive oxygen species, in amounts that results in oxidative stress, and inflammation. The inflamed lung tissue may then release inflammatory mediators, such as cytokines and acute phase proteins, to the blood stream, to be transported to organs and tissues with relevance for pregnancy and development (uterus, placenta, fetus), as well as maternal neuro-endocrine and immune circuits. Here the biologically active mediators may trigger a range of responses which in turn may interfere with development. If NP translocate from the alveoli to the maternal blood stream, they may reach the placenta and be taken by the placental cells. Particle induced generation of ROS and inflammation in fetal tissue. Especially tubular NP have furthermore been proposed to interfere directly with cellular and extracellular constituents and thereby alter vital cellular processes. Finally, toxicity may occur due to the action of released chemical constituents or functionalizations of the NP or contaminants, such as metal catalysts used during manufacture. These may increase generation of ROS, and affect the placenta and the fetus.

17.5 in mice increased Cd in both the uterus and placenta, but no Cd could be detected in the fetuses [63].

Two intravenous injections at GD 16 and 17, each of 0.4 mg of 70 nm silica or 35 nm titanium dioxide (TiO₂) NPs led to the presence of these particles in the placenta, the fetal liver and fetal brain, as evidenced by transmission electron microscopy [64]. Finally, 20–50 nm 0.01% colloidal Au-NM solutions were injected intravenously into mice at GD 16 and 17. Au-NM was found in the exposed placentas at GD 18 alongside an apparent increase in placental endocytosis compared to that of control placentas. No colocalization of NM and endocytosis vesicles was however observed, suggesting that NP were translocated by another mechanism, e.g., passive diffusion. In the fetal organs no detectable levels of gold were found [65]. For iron oxide NPs (Fe₂O₃-NP), Fe content in the placenta and fetal liver increased after intraperitoneal injections of pregnant mice at GD 9–16 with positively but not with negatively charged NP [66].

In conclusion, translocation and organ wide distribution were demonstrated to occur after inhalation and IV administration of NP. As would be expected, the observed systemic availability is much lower after inhalation than after intravenous administration. In addition, smaller NP do present a greater potential for translocation from the lung to the systemic circulation and therefore for subsequent distribution to, e.g., the uterus. When systemically available, placental translocation of particles into the fetus has been demonstrated for various types of NP. Data from ex vivo [58,59,67] and in vitro cellular barrier models of the placenta all indicate that placental transport of NP across the placenta, i.e., from the maternal to the fetal compartment is possible [56,57,68,69]. Furthermore, there was good agreement between findings from the in vitro cell system and the human placenta model [69]. Animal studies using exposure via IV injection indicate that transplacental passage of NM depends on particle characteristics (size, surface coating), route, dose and duration of exposure, as well as on the animal model and timing in pregnancy. The mechanisms underlying translocation of particles across the placenta remains to be elucidated. Of note, a recent study showed a strongly increased transfer of gold NP across the placenta in mice with intrauterine inflammation in comparison to healthy mice [70]. Whether chronic, low-grade inflammation, such as that associated with asthma or obesity, also increases the translocation across the placenta remains to be elucidated.

4. Potential mechanisms in developmental toxicity of inhaled NM

Developmental toxicity may potentially be induced by inhaled engineered NMs through several pathways which may interfere directly or indirectly with the course of pregnancy and fetal development. Importantly, the mechanisms are not mutually exclusive (Fig. 3).

4.1. Particles may generate reactive oxygen species and inflammation

When nano-sized particles are inhaled they may deposit in the airways and lungs, including the alveoli. Many NM are characterized by a high surface reactivity and thus demonstrate a high inherent potential for induction of inflammation and generation of reactive oxygen species (ROS) at the site of deposition [9,11]. ROS generation is generally considered a major causative factor in the toxicity of NMs. This may occur due to properties directly related to the NM, e.g., via surface-mediated reactions, or through activation of oxidative enzymatic pathways in the cells (reviewed in [71]). ROS are usually too unstable to travel far beyond the place of formation [12], but if the balance between oxidant and antioxidant mechanisms is skewed, oxidative stress may arise and induce or exacerbate particle-induced inflammation. Neither the particles nor the inflammatory condition need to be confined to the lungs. Particles may translocate and inflammatory mediators may be released into the systemic circulation [72,73] and transported to organs of importance for pregnancy and fetal development, e.g., the maternal neuro-endocrine circuits, placenta, uterus, and fetus. It is of interest, that systemically available NP may be taken up by placental cells and interfere indirectly with fetal development by

inducing oxidative stress and inflammation therein. Of note, placental cells contain toll like receptors, that has been shown to be involved in the particle induced inflammatory response in the airways [74,75]. Two studies show that exposure of pregnant rodents to CNTs may lead to fetal damage, associated production of ROS and histopathological damage to the placenta [61,76]. Yet another study found exposure to TiO₂ concurrent with oxidative damage in the placenta [64].

4.2. Direct effects of particles on fetal development

Particles that are able to traverse first the pulmonary and subsequently the placental barrier may reach the fetal entity, and among others confer their oxidative and inflammatory action directly in fetal tissues. Furthermore, the size and shape of some NMs make them potentially able to interfere with cell division and cell alignment, crucial events in the developing embryo. As an example, CNTs may interfere with cell division because of their similarity to the cellular microtubules which form the mitotic spindle (Reviewed in [71]).

4.3. Indirect effects due to maternal inflammatory response

When exposure to chemicals occurs in adulthood, toxicological effects may be temporary. During pregnancy, chemical exposures may alter the developmental trajectory of the fetus and permanently shape the physiology and function of the child. The induced alterations are thought to occur as an adaptation by the fetus to an adverse intrauterine environment, to prepare the fetus for the conditions waiting in postnatal life, so-called fetal programming [77], probably via epigenetic mechanisms [78,79]. If this developmental programming does not match the conditions in postnatal life, physiological dysregulation may arise and affect health later in life [80]. Taking into account that low grade chronic inflammation is a leading mechanism of several disorders in adult humans [81], it might not be surprising that maternal inflammation (along with oxidative stress) may interfere with fetal development and alter organ function in the offspring later in life [8,12,13,82–84]. This could be viewed as an aspect of fetal adaptation to the inflammatory environment of the mother.

Systemic inflammation has been reported after pulmonary exposure to NM, and is generally more pronounced than that elicited by larger particles in the bulk form [85]. This may be related to the relatively larger surface contact area of NP, and to the release of additional biological mediators from other internal organs should a quantity of NPs reach the systemic circulation.

One study provides some evidence that NP-induced pregnancy complications may originate from particle induced inflammation. Thus, pregnant mice were exposed to 70 nm silica NP by the IV route. Exposure increased the incidence of pregnancy complications. In the placenta, exposure increased the infiltration of inflammatory cells, especially neutrophil granulocytes, as well as the level of several inflammatory cytokines and upregulation of inflammasome components. Forced expression of interleukin-10 (a cytokine with strong anti-inflammatory properties) prevented pregnancy complications [86].

Evidence of an association between lung exposure to NM, systemic inflammation and fetal abnormalities is however speculative, as only a few, circumstantial, reports on MWCNT have addressed this topic. Thus maternal lung exposure to MWCNT was associated with malformations but only at dose levels which increased leukocyte counts in maternal peripheral blood (a marker of inflammation). It might therefore be speculated that the presence of inflammation at least have contributed to the observed increase in malformation rate [87]. Another indirect link comes from observations of an imbalance in the secretion of progesterone and estradiol, concomitantly with reduced fetal growth and survival [61]. Since inflammatory cytokines may cause endocrine imbalance [88], it might be hypothesized that MWCNT-induced release of cytokines underlies the observed alterations in secretion of progesterone and estradiol in gestation.

Although the relative contribution of the size and content of particles relative to other chemical constituents was not determined, exposure of rats to urban air pollution with a high content of particles ($PM_{2.5}$, 600 µg/m³) before and during pregnancy increased the cytokine of interleukin 4 (IL-4) in the fetal part of the placenta, indicating a placental inflammatory reaction [89].

In summary, although there is some evidence that local and systemic inflammation induced by exposure to NM are associated with fetal developmental abnormalities (which may or may not be mediated by the placenta), there is a paucity of data showing that this chain of events may occur after pulmonary exposure in pregnancy. Importantly, effects might occur in the absence of direct contact of particles with fetal tissues. Thus, in a recent in vitro study, a placental model was exposed to NMs, which were unable to cross the placenta. DNA damage was induced in embryonic cells placed directly below placenta. The genetic damage was found to be perpetrated by a release of ATP into the extracellular space and mitochondria-derived free radicals [90].

4.4. Toxicity mediated by chemicals associated with NM

Toxicity may also occur due to chemicals associated with NM. These may originate from purposeful functionalization of NMs by addition of chemical constituents, or from contaminants such as metal catalysts used during manufacture. These may increase the generation of ROS, and affect the placenta and the embryo/fetus. A well-known example relates to the fetal toxicity caused by release of cadmium from (CdSe)-quantum dots [91].

Overall, most data are generated in experimental animals (mainly rodents) and suggest that maternally mediated effects may predominate. This is not surprising, as only very small quantities of NM will be able to cross the lung barrier [39,43]. Several indirect pathways may potentially be involved in perturbation of pregnancy and developmental toxicity.

5. Adverse effects of maternal airway exposure to nanoparticles during pregnancy

The database on developmental toxicity of engineered NP following inhalation exposure is to date very limited. To achieve our aims, the review will therefore first describe the evidence for developmental toxicity for airborne NP, supplemented with data from studies using other routes of exposure. Some studies investigate effects in several organ systems, their design are described in detail upon their first appearance. Finally, we briefly summarize findings from studies of ambient air pollution and combustion derived particles. In order to identify organ systems that might be sensitive to maternal inhalation exposure and therefore warrant further scrutiny, findings on each organ system is described individually. A separate section is allocated to the evidence from epidemiological studies of ambient, particulate air pollution.

5.1. Gestational and litter parameters

The limited data set on NM does not support adverse effects on classical gestational and litter parameters in experimental animals due to maternal airway exposure to most NM. One study of MWCNT did however observe malformations after a single maternal instillation of MWCNT during gestation. Also inhalation of cadmium NP interfered with maternal and fetal growth. In comparison, maternal inhalation of DE and DEP are associated with effects on offspring weight, at birth, in lactation, and even in adult offspring in several studies.

Most of the studies conducted to evaluate the effects of maternal airway exposure to NP on gestational and litter parameters involve high dose ranges with end-gestational evaluation, as reported in Table 2. In one maternal inhalation study, time mated mice were exposed to 42 mg/m³ TiO₂ NM (UV-titan L181, Kemira, Finland) for 1 hr/day on GD 8-18. The dose from 1 h of exposure to $40 \text{ mg TiO}_2/\text{m}^3$ corresponds to the 8-h time weighted average (TWA) occupational exposure limit according to Danish Regulations. The particles consisted of mainly 21 nm elongated rutile TiO₂. In the exposure atmosphere, 80% of the particles were between 40 and 200 nm in diameter. Of the estimated inhaled dose of 840 µg of TiO₂, approximately 30% reached and persisted in the maternal lung tissue until weaning. The particles caused persistent inflammation in the maternal airways, still present 3 weeks after termination of exposure, as well as acute phase response [9,73,92,93]. Exposure was not associated with effects on gestational or lactation parameters (maternal weight gain, gestation length, litter size, sex distribution, birth and lactation weights, implantations and loss thereof) [9]. The limitation of this study is the single dose level.

Two other studies from the same laboratory addressed the effects of maternal airway exposure to the 14nm carbon black particle of Printex 90, using exposure by inhalation and intratracheal instillation, respectively [10]. Printex 90 has been used extensively as a model for the particulates in diesel emission, as it contains less than 1% organic and inorganic impurities. Time-mated C57BL/6BomTac mice were exposed by inhalation to 42 mg/m³ Printex 90 for 1 h per day on GD 8-18. The daily dose was equivalent to 12h of exposure at the Danish occupational exposure level for carbon black (3.5 mg carbon black/m³). In the exposure atmosphere, the average particle size distribution was highly dominated by sub-100 nm NP, the most abundant size number being approximately 40 nm. The other study administered particles by intratracheal instillation [10]. Time-mated mice were exposed four times during gestation (on GD 7, 10, 15 and 18) to total doses of 11, 54 and 268 µg of Printex 90 (12.2, 2.5 and 0.5 mg/kg), dispersed in clean water. The zeta-size in the particle suspension averaged approximately 140 nm and the number size-distributions peaked at 50-60 nm. The highest dose level was calculated to correspond to the lung deposition in the inhalation study described above [10]. In both studies, exposure induced inflammation and acute phase response in the lungs of the females, but did not affect gestational or lactation measures (assessed as described for TiO_2) [10,73,94,95].

Also MWCNT have been studied in mice. after maternal intratracheal instillation of a single dose of $67 \mu g/mouse$, followed the day after by cohabitation with a male. The particle was the highly bent NM-400 (Nanocyl, Belgium), 10 nm in diameter and 295 nm in length. For instillation, MWCNTs were dispersed in nanopure water with 2% mouse serum. No effects were observed on gestational and litter parameters [96]. Another study assessed the effect of maternal instillation of the MWCNT-7, with an average diameter of 100 nm. One fourth of the particles were longer than $5 \,\mu$ m. For instillation, the MWCNT was suspended in 2% sodium carboxyl methyl cellulose and administered once to pregnant mice on GD9 at 100.8, 135.2, and 162.5 µg/mouse [87]. External and skeletal examinations of fetuses for malformations were performed on GD 18. MWCNT decreased maternal weight on GD 18 and fetal weight at the highest dose level. The number of leukocytes in maternal blood was increased at the highest dose levels. More dams had fetuses with external and skeletal malformations at the two highest dose levels.

Inhalation of 11–15 nm cadmium oxide NP by pregnant mice 2.5 h/day from GD 4.5 to day 17.5 $(230 \,\mu g/m^3)$ decreased the

incidence of implantation, interfered with maternal weight gain and neonatal growth, altered placental weight, and decreased fetal length [63].

Additional information can be obtained from studies of maternal exposure to diesel exhaust (DE; reviewed in [19,20]). Most studies in rodents are indicative of reduced postnatal growth in offspring from exposed dams [19,97,98], although one study demonstrated increased body weight at 10 weeks of age in the in utero exposed mice [99]. Furthermore, paradoxical increases in fetal weight at term after maternal exposure at various stages of pregnancy have also observed in some [100–102] but not other studies [99,103–105]. Preconceptional exposure may also be important. In mice, exposure of dams during the 4 months before mating, but not during pregnancy, did not affect fertility of the dams nor fetal growth. Although birth weight was slightly increased in male offspring, subsequent reduction of postnatal growth was observed in offspring of both sexes after weaning [106].

It is interesting that effects on maternal gestational weight gain and offspring growth during gestation and lactation are found in studies of DE and DEP as well as for NP containing Cd. This indicates that the chemicals associated with the particles (Cd, PAHs) rather than the particulate fraction may be responsible for these effects. Thus, the embryotoxic potential of cadmium has been widely demonstrated previously [62]. Chemicals associated with diesel exhaust have been associated with endocrine disrupting properties, i.e., to alter function(s) of the endocrine system and consequently cause adverse health effects in the intact organism, or its progeny [107-109]. According to the newly proposed "developmental obesogen hypothesis", early exposure to some chemicals may metabolically program the offspring and thus modulate offspring growth, in pre- as well as postnatal life [110]. This may in some cases predispose individuals to increase fat mass and become obese [111], whereas in other cases a suboptimal intrauterine environment may restrict fetal growth. If followed by compensatory body fat accumulation, overeating may increase susceptibility to obesity in an environment with easy access to high-caloric food [112]. It would be interesting to more specifically address this topic by comparing the effects on growth in mother and offspring following exposure to particles devoid of associated chemicals (e.g., Printex 90 carbon black), Printex 90 enriched with PAHs, and PAHs alone, respectively.

5.2. Nervous system

Studies of behavior and brain histology in mice indicate that maternal inhalation exposure to NP may affect the developing nervous system. Findings in studies of DE and DEP provide additional indications that the developing central nervous system may be sensitive to disruption by particulate exposures, although these studies do not delineate the relative contribution from particles, associated chemicals and exhaust gases.

Various studies have assessed the effect of maternal pulmonary exposure to NM (Table 3). Hougaard et al. addressed neurofunction in offspring born to mice exposed by inhalation to 42 mg/m^3 nanosized TiO₂ on GD8-18, 1 h/day, as described in more detail above [9,93]. Exposed offspring of both sexes exhibited altered activity in the open field test, characterized as an inclination to avoid the central area of the maze. Female offspring exhibited enhanced pre-pulse inhibition in the acoustic startle test. Cognitive function assessed in the Morris water maze was not affected. A second study from the same laboratory addressed maternal exposure to carbon black (Printex 90) by intratracheal instillation four times during gestation, at a total dose of 268 µg/animal. Female offspring displayed a somewhat altered habituation pattern in the open field test. No effect was observed in the acoustic startle test [94]. In a recent study ICR mice were intranasally instilled

Ef	fects	of	f materna	l airway	exposure to	NF	on,	gestatio	nal	and	litter	paramete	٢S.
----	-------	----	-----------	----------	-------------	----	-----	----------	-----	-----	--------	----------	-----

Type of NP	Animal species (group size)	Particle size (nm)	Mode of airway exposure	Air particle concentra- tion	Dose (total) or hours/day	Exposure period (GD)	Outcome(s)	Ref.
TiO ₂ (UV-Titan L181)	Mouse (n=12-14)	20.6 (primary), ~100 (aggregate)	Whole body inhalation	42.4 mg/m ³	1 h/day	8–18	Maternal persistent inflammation in lung No effect on gestation or lactation	[9]
Carbon black	Mouse	14 (primary), 41 (aggregate)	Whole body inhalation	42 mg/m ³	1 h/day	8–18	No effect effects on gestation and lactation	[10]
Carbon black	Mouse	14 (primary), 50–60 (aggregate)	Intratracheal instillation		11–268 μg/mouse	7, 10, 15, 18	No effect effects on gestation and lactation	[10,94]
Cadmium oxide	Mouse		Inhalation	100 or 230 μg/m ³	2.5 h every other day or 2.5 h/day	4.5–16.5	Daily inhalation altered placental weight, decreased fetal length and delayed neonatal growth	[63]
MWCNT	Mouse	Length: 5 μm	Intratracheal instillation		3-5 mg/kg (100.8–162.5 μg/mouse	9 e)	At G18 decrease of maternal and fetal weight at highest dose level plus skeletal malforma- tions	[87]
MWCNT	Mouse (<i>n</i> = 14)	Length: 295 Diameter: 10 Aspect ratio: 31	Intratracheal instillation	-	67 μg/mouse	1 day premating	No effect effects on gestation and lactation	[96]

GD: gestation day.

with ultrafine carbon black particles on GD 5 and 9 at a total dose of $190 \mu g/kg$. Male offspring showed enlarged and increased numbers of perivascular macrophages that are regulating the inflammatory response in the CNS, as late as 12 weeks after birth. Moreover, astrocytes in the proximity of these macrophages displayed phenotypic changes similar to that observed in blood vessel damage related to ischemia [113]. No effects on spontaneous activity and acoustic startle response were observed in the offspring of mice preconceptionally exposed to intra-tracheal instillation of MWCNTs (67 μ g/animal), in spite of the presence of long-lasting pulmonary inflammation in the dams [96]. The mere presence of persistent pulmonary inflammation (and the related systemic consequences) during gestation did therefore suffice to change function of the assessed domains in the offspring.

Additional information can be obtained from studies of maternal exposure to ambient air pollution or resuspended particles in aerosols (reviewed in [19,20]). Maternal gestational exposure to DE (0.3–3 mg/m³) at GD 2–16 induced extensive pathology such as apoptosis and capillary stenosis and occlusion in the brain of 11 weeks old offspring [114] and decreased the number of Purkinje cells in the cerebellum [115] in ICR mice. A similar exposure regimen applied on GD 2–16 and again on PND 0–16 altered the levels of mRNA encoding for proteins involved in reaction to chemically induced stress (including oxidative stress) and endocrine regulation in both sexes as measured during lactation [108]. Prenatal exposure to whole DE have been shown to reduce spontaneous motor activity, impair motor coordination and function of monoaminergic systems in various brain regions, and induce impulsive behavior [116–118]. DEP exposure (1000 μ g/m³) during pregnancy and nursing increased locomotor activity, self-grooming in the presence of an unfamiliar mouse, and rearing behavior in the adult male offspring [119]. Prenatal exposure to DE on GD 9–17 increased fetal brain cytokine response at GD 18 and reduced activity in male offspring. When exposed to a high fat diet males had higher insulin levels and both sexes showed increased activation of microglia within several brain regions [120]. Inhalation exposure of female C57BL/6J mice from 7 weeks before conception until GD 18 to nanoscale particulate matter $(350 \,\mu g/m^3)$ impaired the in vitro differentiation of cerebral cortex neurons obtained from 1 day old offspring. Despite normal physical development, 8 months old exposed males displayed decreased latency, frequency, and duration of immobility in the tail suspension test, whereas exposed female offspring behaved as controls [121].

At present, the number of studies on effects of exposure to NPs during pregnancy on the nervous system is limited. The parameters that were investigated differ between the studies, making it difficult to draw conclusions on similarities and differences in nervous system effects caused by the various materials. Furthermore, the experimental designs of the studies differ considerably with respect to route, time and duration of exposure, ages of the offspring at testing, etc. Thus, prenatal exposure to NPs, DE, and DEP have been associated with effects on locomotor activity in the offspring in a number of studies, but both increases and reductions have been reported, and in some cases only more specific

Table 3
Effects of maternal airway exposure to NP on the nervous system of the offspring.

Type of NP	Animal species (group size)	Particle size (nm)	Mode of airway exposure	Air particle concentra- tion	Dose (total) or hours/day	Exposure period (GD)	Outcome(s)	Ref.
TiO ₂ (UV-Titan L181)	Mouse (<i>n</i> = 10–14)	20.6 (primary), ~100 (aggregate)	Whole body inhalation	42.4 mg/m ³	1 h/day	8–18	Exposed offspring avoided central zone of open field Female offspring displayed enhanced prepulse inhibition Cognitive function in Morris maze not affected	[9]
Carbon black (Printex 90)	Mouse (<i>n</i> = 17–24)	14 (primary), 50–60 (aggregate)	Intratracheal instillation	-	0, 11, 54 or 268 µg/animal	7, 10, 15, 18	Female offspring displayed altered habituation pattern in open field Acoustic startle and prepulse inhibition not affected	[94]
MWCNT	Mouse (<i>n</i> = 14)	Length: 295 Diameter: 10 Aspect ratio: 31	Intratracheal instillation	-	67 µg/animal	1 day premating	No effect on locomotor activity and startle response in males	[96]
Ultrafine Carbon black	Mouse (n=5)	14 (primary), 84.2 (agglomer- ate)	Intranasal deposition	-	190 µg/kg	5,9	Male offspring showed enlarged and increased numbers of perivascular macrophages and nearby astrocytes displayed phenotypic changes	[113]

GD: gestation day; PND: postnatal day.

measures has been affected, e.g., the propensity to enter the central part of a maze. It is therefore not clear whether these apparent similar or dissimilar effects can be attributed to the test material, or even if absence of effects might be ascribed to differences in the applied test designs. Further contributing to the complexity, the studies of DE and DEP imply exposure to mixtures of various particulate matters with dissimilar contents of associated chemicals, and, in the case of DE, also gases that may differ in composition between studies. This makes it difficult to delineate whether observations may be ascribed to particles or other chemical components. Of note, the mere presence of persistent pulmonary inflammation (and the related systemic consequences) does not seem to explain the neurobehavioral effects observed for titanium dioxide and carbon black, since no neurological effects were observed in offspring of mothers exposed to MWCNTs pre-conception, in spite of longlasting pulmonary inflammation.

5.3. Reproductive system

The literature, to date, provides some, limited evidence, that NP may affect fetal development of the male reproductive system. Reproductive function in female offspring has hardly been studied and cannot be commented upon.

A number of studies have examined maternally mediated effects of NP exposure to the reproductive health of their male offspring, using administration via the airways as well as other routes of administration (Table 4. Pregnant mice were exposed to 14 nm carbon NPs during gestation following intratracheal administration of 0.2 mg at GD 7 and 14. In the exposed offspring, partial vacuolation of the seminiferous tubules, other testicular structural changes and significant reductions in daily sperm production (DSP) were observed [122]. Kyjovska and co-workers [123] examined the impact on DSP in F1 and F2 male mouse offspring following maternal inhalation of 42 mg/m³ nanosized TiO₂, 1 h/day, on GD 8–18 [9.93] or intratracheal instillation of carbon black to a total dose of 268 µg of Printex 90 divided between GD 7, 10, 15 and 18 [10] (both studies have been described in more detail above). DSP was not statistically significantly altered in the F1 generation for either exposure group, although TiO₂ tended to reduce sperm counts in the F1 offspring, with no observed effects carried to the F2 generation. For carbon black, F2 offspring whose fathers were prenatally exposed to NP showed a lowering of DSP, whereas no effect was observed in F2 offspring from the exposed F1 females. Neither exposure statistically significantly affected the time it took to deliver the first litter, when the exposed F1 male and female offspring cohabited with unexposed partners [9,93,123]. One recent study extended the typical dosing regimen to examine the effects of preconception exposure. Female C57BL/6J mice were intratracheally instilled with 67 μg MWCNT (NM 400) and then bred the next day with an unexposed male. No changes in DSP were reported in the male offspring. Notably, the lung inflammation due to MCWNT exposure would have been expected to be present throughout gestation [96]. Supplementary information is available for the subcutaneous route. When 25-70 nm TiO₂ anatase NP were administered four times between GD 3 and 14, particles accumulated in offspring testis and affected DSP [124]. Overall, there is some indication that NP are able to affect reproductive function in the male offspring, but the pattern of effects differs between studies. This could well owe to the choice of route of administration, dose and type of material.

Although prenatal exposure to TiO_2 did not affect the time it took the F1 females to deliver their first litter when cohabiting

Effects of maternal airway	y exposure to NP on the	e reproductive system of th	ie offspring.					
Type of NP	Animal species (group size)	Particle size (nm)	Mode of airway exposure	Air particle concentration	Dose (total) or hours/day	Exposure period (GD)	Outcome(s)	Ref.
TiO ₂ (UV-Titan L181)	Mouse (<i>n</i> = 10–14)	20.6 (primary). ~100 (aggregate)	Whole body inhalation	42.4 mg/m ³	1 h/day	00 10 00	When F1 male and female offspring were mated with were mated with where was no effect on time to delivery of the first F2 litter F1 males showed a tendency toward rendency toward rendency toward rendency toward from either the male or female germline F2 male offspring from either the male or female germline F2 not offspring from either the male or female germline F2 not offspring from either the male or female germline from either the male or female germline from either the male	[9,93,123,149]
CdO	Mouse (<i>n</i> = 8–19)	11 nm at 100 μg/m ³ 15 nm at 230 μg/m ³	Nose-only inhalation	100 or 230 μg/m³	2.5 h every other day or 2.5 h/day	4.5-16.5	No reports of reproductive effect in F1	[63]
Carbon black	Mouse	14 nm	Intratracheal instillation		0.2 mg/mouse	7 and 14	Exposure to CB affected F1 male reproductive function adversely, with impact on DSP, semi niferous tubules and serum testosterone	[122]
Carbon black (Printex 90)	Mouse (<i>n</i> = 12–13)	14 (primary), 50-60 (aggregate)	Intratracheal instillation	1	268 µg/mouse	7, 10, 15, 18	When F1 male and female offspring were mated with unexposed offspring, there was no effect on time to delivery of the first F2 litter No effect on DSP in F1 males, but F2 males showed lower sperm production, when their F1 father had been exposed in utero (not their F1 mother)	[10,123,151]
MWCNT	Mouse $(n = 14)$	Length: 295 Diameter: 10 Aspect ratio: 31	Intratracheal instillation	I	67 μg/mouse	1 day premating	No effect on DSP in the offspring	[96]
GD: gestation day; PND: I	oostnatal day; DSP: dail	ly sperm production.						

128

K.S. Hougaard et al. / Reproductive Toxicology 56 (2015) 118–140

	٠
	۰.
	•
S I	
e	
-	-

Table 5 Studies investigating t _i	he relationship betv	ween nanoparticle expo	sure during pregnancy	and biodistribution and t	toxicity in embryonic and	l extraembryonic tissues.		
Type of NP	Animal species	Particle size (nm)	Route of exposure	Dose	Exposure period (GD)	Biodistribution to (method of analysis)	Toxicity	Ref.
Metal based NM Gold	Mouse	20, 50	2	50 μg/mouse	16 and 17	Placenta	NE	[65]
Gold	Mouse	3, 13, 32	N	0.8 mg/kg	17	Placenta Placenta Fetus after LPS stimulus	NE	[70]
Gold	Mouse	3, 13, 32	2	0.9, 7.2 mg/kg	5.5-15.5	(ICP-MS) Placenta Fetus	None	[47]
Gold	Mouse	2, 40	2	0.4 mg/kg (2 mm) 1.9 mg/kg	16–18	Extraembryonic tissues (ICP-MS) Maternal liver and spleen Not placenta and fetus (AMG)	Ë	[163]
Silver	Mouse	50	2	(40 nm) 35 or 66 μg/mouse	7,8,9	Placenta (0.2%) Yolk sac (0.3%) Fmbrvos (0.008%)	None	[155]
TiO ₂	Mouse	217	2	0.8 mg/mouse	16, 17	(ICP-MS, TEM, EDS) Placenta, fetal liver and brain	Reduced fetal size	[64]
SiO ₂	Mouse	65	2	0.8 mg/mouse	16, 17	(TEM) Placenta, fetal liver and brain	Placental dysfunctions Increased fetal resorptions	[64]
CdTe/CdS QD	Mouse	1.67-4.2	N	20-125 µg/mouse	1–5 days before deliverv	(TEM, WBF) Fetuses and pups (ICP-AFS)	Reduced fetal size Reduced pup survival at high concentration	[62]
Silver	Mouse	20	Oral	10, 100, 1000 mg/kg	9	Fetal liver (TEM)	Reduced viability of offspring	[159]
Silver	Rat	35	Oral	1.69 mg/kg	20	Fetus (0.003–0.03%) (Scintillation counter)	NE	[191]
Silver	Rat	ø	Oral	62.5, 125, 250 mg/kg	52 days (including	NE	None	[162]
ZnO	Rat	<100	Oral	500 mg/kg	39 days (including pregnancy)	Liver and kidney of pups (ICP-MS)	Reduced number of born/live pups, decreased body weights of pups and increased fearl reconstion	[127]
TiO ₂ rutile	Mouse	50 (472)	Oral	10, 100, 1000 ma/ka	6	NE	Morphological defects Reduced visibility	[159]
TiO ₂ anatase	Mouse	25-70	s.c.	100 µg/mouse	3,7,10,14	Testis and brain of offspring (FE-SEM/EDS)	Reduced daily sperm production Apoptosis of olfactory bulb neurons	[124]
Carbon based NM Fullerenes	Rat	2	2	0.3 mg/kg	GD 15 to PND 8	Placenta (2%) Embryo (0.9%)	NE	[60]
Fullerenes	Mouse	<100	IV	Not specified	8	(Scintiliation counter) Placenta and yolk sac (Placenid DNA content)	NE	[156]
Fullerenes SWCNT (oxvdized)	Mouse Mouse	143 200–400	2 2	0.8 mg/mouse 0.1-30 µg/mouse	16 5.5		None Fetal morphological abnormalities	[64] [76]

K.S. Hougaard et al. / Reproductive Toxicology 56 (2015) 118-140

Type of NP	Animal species	Particle size (nm)	Route of exposure	Dose	Exposure period (GD)	Biodistribution to (method of analysis)	Toxicity	Ref.
SWCNT (PEG)	Mouse	06	IV	0.1, 10, 30 u.g/mouse	5.5, 8.5, 11.5	Placenta and yolk sac (WBF.TF)	Occasional teratogenic effects at the highest dose	[157]
SWCNT (PEG)	Mouse (p53+/-)	500-2000 length, 1-2 outer	2	2 mg/kg	10.5, 12.5, 15.5	Placenta and fetal liver (PET, TEM)	None	[158]
MWCNT (PEG)	Mouse (p53 ^{+/-})	diameter 500–2000 length, <8, 20–30, 50 outer diameter	2	2 and 5 mg/kg	10.5, 12.5, 15.5	Placenta and fetal liver (PET, TEM)	MWCNT-50 Reduced fetal weight Brain malformation Reduced offspring survival	[158]
MWCNT	Mouse	1000–2000 length, 10–30	2	4, 20 mg/kg	17	Placenta and fetal liver (Scintillation counter TEM, Raman)	Increased abortion rate, placental vascular alterations	[61]
SWCNT	Mouse	alameter 5–30 µm	Oral	10 mg/kg	6	NE	Increased resorption rate,	[161]
Fullerenes	Mouse	lengui NE	dI	25-137 mg/kg	10	Yolk sac and embryos (Histology)	Fetal abnormalities	[164]
GD: gestational day a coupled plasma atom	nt administration; NE: nic emission spectrosco	not evaluated; PND: pos opy; ICP-MS: inductively	tnatal day. AMG: aut coupled plasma mas	ometallography; EDS: ε s spectrometry; PET: po	energy-dispersive X-ray spe ositron emission tomograpi	ctroscopy; FE-SEM: field emission sc hy; TEM: transmission electron micro	anning electron microscope; ICP-AE oscopy; TF: tissue fluorescence; WBF	S: inductively ?: whole body

K.S. Hougaard et al. / Reproductive Toxicology 56 (2015) 118-140

An additional study, with oral exposure, examined maternally mediated toxicity of ZnO NPs in rats. Mothers were exposed daily via oral gavage to 500 mg/kg ZnO NPs starting 2 weeks prior to mating and continuing until postnatal day 4. Exposure reduced the number of born/live pups and their body weights, whereas histopathological examination of offspring ovaries, testes and epididymis revealed no abnormal findings [127].

A body of evidence links health effects in the offspring to DEP exposure via the mother. Maternally mediated reproductive outcomes include effects on fetal testis and ovary development as well as longer term consequences such as impairment of spermatogenesis or altered endocrine levels in adulthood (reviewed in [20]). As an example, Li et al. assessed the reproductive function of male offspring on PND 28, after maternal exposure to clean air, filtered DE or nanoparticle-rich DE [109]. The relative weights of the seminal vesicle and prostate decreased after exposure to either diesel exposure compared with air controls, as did serum levels of multiple serum hormones, suggesting that prenatal exposure to particulate air pollution leads to endocrine disruption after birth and suppresses testicular function. Because the exposure groups had similar physiological responses, the authors conclude that in this case the particles in DE did not specifically contribute to the observed reproductive toxicity [109]. No indications of endocrine disruption were however observed in a study where pregnant mice inhaled 20 mg/m³ of re-suspended nanosized DEP (SRM2975) with a very low content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), or clean air for 1 h/day on GD 7-19. The exposed male offspring exhibited reduced DSP, but no differences in testicular weight or in anogenital distance. There was also no difference in gene regulation of several testicular hormonal receptors compared to the sham controls. This latter study therefore indicates that the particles were involved in the reproductive effects observed in offspring [128]. As also described for gestational and litter parameters, it is unclear if studies of DE and DEP support findings for NP, as well as the degree to which particle associated chemicals and exhaust gases contribute to the observed effects.

It is apparent that there are so many different variables relative to study design and particles in each of the studies that report positive or negative findings that an overall conclusion is difficult to make with regard to the potential hazard of NP the (male) reproductive system. A key challenge in reviewing the literature is lack of standard protocol studies, and even application of state-of-the-art methods.

5.4. Immune system

fluorescence.

Effects on offspring immune function following maternal airway exposure to NP during pregnancy are still incompletely studied and comparison of existing studies is hampered due to the use of very different study designs. Findings do indicate that NP may interfere with allergy development. This is corroborated by one study of micro-sized particles and most studies of maternal DE and PM exposure. To our knowledge, studies of other immune diseases, such as autoimmune responses, do not exist.

Except from one recent paper [129] and an yet unpublished report [130], we are not aware of studies that describe maternal NP exposure and the resulting adverse effects on the immune responses in the offspring. In one animal study, female C57Bl/6

mice were intratracheally instilled with 67 µg of MWCNT on the day before mating. Starting at three weeks of age, the offspring were sensitized and later underwent airway challenge to a model allergen. Lower allergen-specific IgE and IgG1 responses in serum, but higher inflammatory cell levels in lung fluid were observed in exposed compared to control offspring. Tolerance development was not affected [130]. El-Sayed et al. administered 95 μ g/kg carbon black particles to pregnant ICR mice by intratracheal instillation at GD 9 and 15. Thymocyte and splenocyte populations were phenotyped at PND 5 in male offspring. Offspring from exposed dams had higher total cell counts also leading to significantly increased numbers of the investigated cell populations. mRNA levels of genes related to induction of peripheral tolerance were upregulated in spleen [129]. In a similar study using microsized particles $(\approx 1 \,\mu m)$, BALB/c mice received a single 50 μg intranasal dose of TiO₂, DE or carbon black particle exposure on GD 14. After birth, the offspring were sensitized and airway challenged with allergen. Offspring of mothers exposed to particles developed airway allergy, evidenced by allergic inflammation and airway hyper responsiveness, which was absent in control offspring [131]. The effect of maternal TiO₂ exposure was ascribed to impaired clearance of particles by macrophages and thus a greater inflammatory response in the dams [132]. The latter finding indicates that "inert" particles may become inflammogenic in pregnancy, due to alterations in hormonal balance that subsequently changes regulation of uptake of particles by alveolar macrophages and thus lessens clearance of particles from the maternal lungs.

Maternal gestational exposure to particles in the form of DE, DEP or PM and effects on the offspring adaptive immune response has been studied in several rodent models. Offspring exposed to DE and sensitized to an allergen often showed changes in allergen-specific outcomes indicative of a more "allergic" phenotype, such as specific IgE, lymphocyte cytokine secretion, airway inflammation and hyper responsiveness, [104,131,133]. The opposite [134] or no effects on general immune function [135] have however also been reported. In naïve (non-sensitized) offspring, maternal PM exposure modulated T-helper type cell (Th) immune responses, so that Th2 responses were exaggerated and Th1 responses were suppressed [136]. Maternal PM exposure also aggravated offspring airway inflammation and induced hyper responsiveness to airway challenge by inhalation of ozone [137,138].

As also noted above, PM is a proxy for the particulate content in DE, tobacco and wood smoke, but also co-varies with the content of associated chemicals such as polyaromatic hydrocarbons, metals, and a wide range of other chemicals. This hampers the ability to conclude directly on the correlation between maternal particle exposure and adverse immunological outcomes in the offspring. Furthermore, about half of the cited studies lack information on the number of pregnant animals and/or the number of pups used from each litter, precluding evaluation of the potential for litter effects (and thereby inflation of group size) in the analysis of outcomes [129,131,137,138]. Further, only few dose-response studies were performed [135,136] and most studies relied on a single or few maternal lung/nose depositions rather than repeated inhalation exposures. Deposition of particles directly in the airways by, e.g., instillation, implies a much higher dose-rate compared to inhalation. The route, manner of administration, timing of immunization as well as choice of allergen and dose may be highly decisive for the allergic phenotype [139]. The studies reporting protection from allergy [134] or no effect on general immune function [135] were based on maternal DE inhalation and the use of antigens very different from the majority of studies that used the model allergen of chicken egg albumin. One study with maternal carbon nanotube instillation [130] and one with DE inhalation [134] both showed antibody suppression in offspring in contrast to the majority of studies demonstrating development of a more allergic phenotype,

however antibody measurements were not always included. Again, mode of offspring immunization, choice of particles and differences in maternal exposures may explain such observations.

5.5. Metabolic system

Metabolic function has not been studied for engineered nanomaterials, and only little information is available relative to prenatal exposure to DEP. Gene expression was however measured in livers from newborn offspring from mothers exposed to carbon black NP by intratracheal instillation and TiO₂ NP by inhalation [93,95], as described above. For carbon black, several genes and biological pathways were differentially expressed in exposed offspring, hereof some with relation to metabolic function (cellular signaling, inflammation, cell cycle and lipid metabolism) in female offspring. In males, subtle changes were observed in genes related to metabolism [95]. For TiO₂ much fewer genes were differentially expressed, and only very slight indication of effects on metabolic function was observed [93].

Some additional information is available from a study on DE. Pregnant mice were exposed to 2.0 mg/m^3 of DE (i.e., PM and gases including O₂, CO, NO and NO₂, and SO₂) in whole body exposure chambers for 4 h per day, GD 9-17. Exposure reduced birth weight, but as adults the male offspring were heavier and displayed higher non-fasting plasma insulin concentrations. These effects were not observed in females. When fed a high-fat diet, no differential effect on exposed males was observed, whereas the exposed female offspring gained much more weight than female offspring from sham exposed mothers [120]. As discussed in Section 5.1, some chemicals associated with diesel exhaust and particles have been associated with endocrine disruption, and some endocrine disrupting chemicals have been proposed as to be "developmental obesogens" and predispose individuals to increase fat mass and become obese. Also, maternal inflammation is proposed to interact with fetal development of metabolic function [140]. At present, there is no evidence of metabolic developmental programming by NP, but the described changes in gene expression in newborn offspring from NP exposed dams as well as the emerging hypotheses of maternal inflammation as a modulator of offspring metabolism warrants this to be studied in more detail.

5.6. Cardiovascular system

Although very little studied, the reported findings are suggestive of a potential for in utero particulate exposure to affect development of the cardiovascular system adversely.

Inhalation of $11 \text{ mg/m}^3 \text{ TiO}_2 \text{ NP}$ during pregnancy, 5 h a day, for an average of 8 days, abolished the endothelium-dependent reactivity of vessels in the offspring. Together with a lack of response to nitric oxide, these findings indicate that exposure compromised the normal microvascular dilation in fetal vasculature [141]. Further studies demonstrated that microvascular dysfunction coincided with a reduction in the maximal mitochondrial respiration in both cardiac and uterine tissues [142]. These results indicate that prenatal NM exposure impairs microvascular function in the offspring and may persist through multiple developmental stages.

One report describes increased expression of Collagen type VIIIa1 (Col8a1) in the tubular cells in the kidneys of 12 (but not 3) weeks old offspring of mice instilled intranasally on GD 5 and 9 with a total of 100 μ g of carbon black NM [143]. Although indices of renal function did not differ between exposed and control offspring, this observation may be interpreted as a sign of tubulo-interstitial renal fibrosis, which might pose a risk for development of hypertension later in life.

Further evidence may be gathered from studies of an atmosphere of air pollution. Gestational and/or postnatal exposure of mice for up to 3 months after birth to Sao Paulo filtered or unfiltered urban air ($PM_{2.5}$: $2.9 \pm 3.0 \,\mu$ g/m³ and $16.9 \pm 8.3 \,\mu$ g/m³, respectively) was associated with increased lipid peroxidation in the hearts of the exposed offspring in adulthood [144]. Mice exposed to filtered or non-filtered air at $PM_{2.5}$ concentrations of 300 μ g/m³, 6 h per day, 5 days/week, during pregnancy or in the early postnatal period had increased susceptibility to develop heart failure induced by pressure-overload [145]. A similar exposure applied only throughout pregnancy affected only young adult male mice, exhibiting increased body weight, reduced blood pressure without change in basal cardiac function, and a higher susceptibility to heart failure than controls [99]. More recently, it was shown in mice that daily exposure during gestation and until weaning to ambient air particles at a concentration of 51.69 μ g/m³, 6 h/day, 7 days a week induced persistent cardiac dysfunction in the adult offspring [146].

Most of the described experiments have focused on maternal exposure to airborne ambient pollution, for which the differential effects of the particulate fraction and chemicals components cannot be directly inferred. Although cautiousness is called for in interpretation of the findings, the potential for engineered NP to interfere with cardiovascular development ought to be investigated.

5.7. Genotoxicity and mutations in somatic and germline tissues

Prenatal exposure to carbon black NP by inhalation (but not instillation) has been shown to induce increased levels of DNA strand breaks in offspring livers, whereas prenatal exposure to TiO_2 NP at the same dose and to resuspended DEP (NIST2975) at half the dose did not. Prenatal exposure to carbon black NP, TiO_2 NP and DEP NIST2975 had no effect on microsatellite instability of the female germline, whereas prenatal exposure to DEP NIST2975 lead to increased microsatellite instability of the male germline. The potential effects of NP exposure on the male germline have yet to be assessed.

The genetic material in fetuses consists of DNA in somatic tissues, which originates from the father and the mother, and DNA in the germline cells, which are established at early stages during fetal development. Some studies have investigated DNA damage in offspring somatic tissue (liver) following maternal pulmonary exposure to NP by use of the comet assay for detection of DNA strand break levels. The liver was chosen as target because the fetal liver receives a major portion of the blood after nutrient exchange at the placenta, and because pulmonary exposure to carbon NP has been shown to induce DNA damage in liver tissue of adult mice [10,147]. Neither maternal gestational exposure by inhalation to TiO₂ NP nor the DEP NIST 2975 increased DNA strand break levels in offspring livers at PND 2 (and 22 for TiO₂) [19,93]. Maternal inhalation of carbon black NM induced increased DNA strand breaks in liver tissue from 22 and 50 days old offspring, but not from 2 day old offspring. The lack of significance at GD 2 might be due to a consistently observed high background level of DNA strand breaks due to the sudden increase in fetal O2 levels at birth [10]. Interestingly, when dams were exposed to carbon black NM by intratracheal instillation during pregnancy (as opposed to inhalation), no increase in DNA strand breaks was observed at any age (2, 22, and 50 days). Thus, only maternal exposure to carbon black by inhalation increased DNA strand breaks in offspring livers at PND 22 and 50. The inhalation exposure was by whole-body exposure, and therefore the oral exposure of the pregnant dams is likely larger during inhalation exposure due to licking of the fur [10].

Germline cells may also be vulnerable to genetic damage. Mutations in the germline can be studied by means of microsatellite instability of expanded simple tandem repeat (ESTR) loci in mice [148], to detect large deletions and insertions at these specific loci in the DNA. This is possible because mice exhibit high spontaneous mutation rates in the ESTR loci [149]. The oocyte, i.e., the female germline, has been regarded rather resistant to the action of genotoxins, when exposure occurs in adulthood [150]. This might also be the case when exposure takes place during fetal life. Indeed, microsatellites of the female germline cells were unaffected following maternal gestational airway exposure in the studies of TiO₂ and carbon black NP in the studies described in more detail above, as well as after maternal inhalation of standard material diesel exhaust particle NIST2975 (which contains low levels of PAHs) [149,151,152]. In contrast, male offspring whose mothers inhaled the diesel exhaust particle of NIST2975 displayed increased microsatellite instability, indicating that the effect was induced in utero. The effect of the prenatal exposure to DEP was permanent, as microsatellite instability were present in the adult offspring months after exposure was terminated [152]. The susceptibility of male germ cells to insult by particle exposure is supported by studies in adult mice. When adult mice were exposed to air pollution downwind from a steel mill, male mice had significantly increased levels of microsatellite instability as well as increased levels of DNA strand breaks in germ cells, whereas the increase was statistically insignificant in female mice [153,154]. Interestingly, testicular DNA was hypermethylated in exposed compared to control mice exposed to filtered air [153]. Absence of bulky DNA adducts and the presence of hypermethylated DNA in testes suggest that the effect is likely mediated by more indirect mechanisms such as systemic circulation of inflammatory mediators rather than circulating PAHs from the particles [153]. In contrast to mutations induced in male offspring during fetal life, mutations induced in adult male mice in adulthood seem to be transient. Thus, microsatellite instability was detected 6 weeks after exposure of the adult male mice, but not 3 or 10 weeks post-exposure [153]. The effect of prenatal exposure to NP on the male germline has not yet been studied to the best of our knowledge. However, if the underlying mechanism involves systemic inflammation rather than particle-associated chemicals, prenatal exposure to NP could potentially induce microsatellite instability in the germline of male offspring.

6. Developmental effects of NP using systemic routes of administration

The possibility that exposure to NP during pregnancy could lead to adverse health effects on the embryo has been investigated using also other routes of exposure than inhalation. Table 5 provides a summary of these studies, investigating the relationship between NP exposure during pregnancy and biodistribution and toxicity to embryonic and extra-embryonic tissues. IV exposure is the most commonly used route of exposure in exploration of the ability of different types of NP to reach the placenta and the fetus and/or induce placental and fetal morphological alterations. This route is obviously not representative for environmental and occupational scenarios, where inhalation is the primary route of exposure. It does however allow for evaluation of the potential for direct effects of the administered material, since it bypasses translocation over the lung barrier at the port of entry in inhalation. As a result, the relationship between the administered doses and the corresponding effects can be estimated.

With very few exceptions, the available data from rodent studies indicate that systemically administered NP are able to reach the placenta, cross the blood–placental barrier and accumulate in fetal tissues. Although not many studies have quantified the amount of NPs able to reach the placenta and translocate to the fetus, the results suggest that the exposure to NP may cause adverse health effects on the pregnant dam and fetus. Negative effects appear to depend on chemical composition as well as several physico-chemical characteristics, including size, shape and functionalization.

Among metal based NPs, gold NP administered to mice have been shown to reach the placenta and translocate to the fetus. Overall, translocation seems to depend on NP size and functionalization, as well as gestational stage and inflammatory status of the uterus [47,65,70], clearly indicating that several factors influence the ability of NPs to cross the blood-placental barrier. Gold NPs, although able to distribute in embryonic and extra-embryonic tissues, do not seem to adversely affect embryonic development, even at the highest dose of 7.2 µg Au/g body weight [47]. This finding appears to be mirrored for silver NPs. When silver NP were administered at GD 9.5, i.e., prior to formation of the placental barrier in the mouse, silver was detected in the extra-embryonic tissues (mainly the yolk sac) and only in very low amounts in the embryo (0.008% of the administered dose). No interference with proper development was observed [155], but morphological analysis of the embryo was performed at GD 10, when organogenesis is far from complete.

In contrast, intravenous administration of 35 nm TiO₂ and 70 nm SiO₂ NP in late gestation, was associated with in utero growth restriction and increased rates of fetal resorption [64] at the very high dose levels of 1.6 mg/mouse, administered as two separate doses of 0.8 mg/mouse at GD 16 and 17, respectively. When reduced by half no effects were observed, suggesting that these NP represent a risk for pregnancy only in the case of massive exposure at a high dose rate. The dose of the administered material may therefore be a key point in mediation of NP developmental toxicity. It could be speculated that the adverse effects might originate from accumulation of NPs (and/or ions released from the particles) in the placenta that subsequently induced vascular dysfunction, and accumulation in embryonic tissues, where they may physically interfere with developmental mechanisms. Carbon based NP, systemically administered, are also able to distribute to the placenta and yolk sac and partly translocate to the fetus. This is true for fullerenes of different sizes, administered either before placentation is initiated [156], or later in gestation [60]. Interestingly, even at very high doses (0.8 mg/mouse), at which other NPs induce severe fetal effects, fullerenes were non-toxic [62]. In comparison, SWCNT and MWCNT interfere with placental and embryonic morphogenesis in a size, concentration and functionalization dependent manner [61,76,157,158]. Intravenously injected short SWCNT have been shown to induce a wide range of morphological alterations to embryos at concentrations as low as 100 ng/mouse. While functionalization of SWCNT with COOH groups exacerbates embryotoxicity [76], the introduction of polyethylenglycol chains strongly reduces this effect [157,158]. The diameter also appears an important mediating factor in embryotoxicity, at least for MWCNTs. Thus, IV administered MWCNT accumulated in the placenta, irrespective of diameter (outer diameter >8, 20–30 and 50 nm) but only induced fetal growth restriction, brain malformations and reduced pup survival when the outer diameter was large (50 nm) [158].

The use of NP in consumer products, such as cosmetics and food, requires assessment of developmental toxicity after oral and dermal administration. While studies using dermal application are lacking, a few studies have investigated the effect of acute and chronic exposure to NP after oral administration. After a single administration during organogenesis (GD 9), Ag NPs reached the fetal liver and kidney, as evaluated by TEM. At the lowest dose (10 mg/kg), fetal viability was significantly reduced, while at much higher concentrations (100 and 1000 mg/kg) no adverse effects on both dams and fetuses were observed [159]. These results appear in line with what was observed by Mwilu et al. [160]. Ag NPs exposed to simulated stomach fluid aggregated and also released ionic silver, which in turn associated with aggregates as silver chloride. It could be then speculated that at high concentrations Ag NP agglomerated in the stomach, and thereby reduced absorption and increased clearance. In this same study, the effect of oral administration of TiO₂ was also evaluated. Differently from what observed for Ag, adverse effects of TiO₂ were observed only at the highest concentrations of 100 and 1000 mg/kg [159], suggesting that agglomeration did not occur for these NP. Similar results were obtained in parallel studies using SWCNTs [161]. Interestingly, chronic oral administration of small Ag NPs (8 nm) to rats before and throughout gestation was not associated with toxic effects [162], while chronic administration of ZnO NP (500 mg/kg) induced fetal resorptions and reduced the number of live pups [115].

Very few studies have evaluated the effect of NP after intraperitoneal and subcutaneous injection; the reason probably resides in the low significance of these two routes for risk assessment of human exposure to NM. After intraperitoneal injection, gold NP (2 and 40 nm) were not detected in either the placenta or the fetus [163], whereas fullerenes (of non-specified size) distributed not only to the yolk sac and embryos, but also induced severe morphological abnormalities [164].

7. Support from epidemiological studies

At present there are no sound epidemiological studies that have assessed the developmental toxicity of NM. This section therefore focuses on unintentionally produced particles such as particulate matter (PM) generated from automotive, industrial and household emissions. Most of the evidence is accumulated from 1999 onwards. The research field is, just like for animal research on NP effects, rapidly expanding, and the literature published so far needs to be interpreted with caution. Assessment of air pollution exposure (including outdoor and indoor levels) during pregnancy is challenging. In addition, other environmental factors may correlate with air levels of particulate matter, e.g., noise [165] and meteorological factors, which may influence specific birth outcomes on their own and act as confounders.

The largest body of evidence relates to the associations between maternal exposure to PM and effects on birth weight (corrected for gestational age). In a meta-analysis of studies in 14 centers, an increase by $10 \,\mu g/m^3$ in PM₁₀ concentration was associated with a decrease of 9g (95% confidence interval, 5; 13) in mean birth weight adjusted for gestational duration and other covariates, and an odds-ratio of 1.02 in risk for term low birth weight (95% confidence interval, 1.01–1.04) [166]. By use of land-use regression models in urban areas, the association between maternal exposure and low birth weight at term was stronger [166]. Associations of PM levels with head circumference have also been reported [166]. Thus, the evidence regarding PM effects on birth weight-related outcomes can be seen as strong.

There is intermediate to strong evidence for an effect of maternal inhalation of PM and other atmospheric pollutants on the risk of preeclampsia, a pregnancy complication characterized by maternal hypertension in conjunction with excretion of protein in urine, which constitutes a major cause of preterm delivery (recently reviewed in [167]. Association with the risk of premature rupture of membranes is also plausible [168]. Many studies have linked PM exposure to the risk of preterm delivery (i.e., before 37 gestational weeks). Although formal meta-analyses are lacking, the evidence appears less consistent than for birth weight.

Effects on the occurrence of congenital malformations are, generally, challenging to study in humans [169]. Currently, there is strongest evidence regarding maternal exposure to PM and other atmospheric pollutants for cardiac congenital malformations such as atrial septal defects [170]. A more recent meta-analysis observed significant associations only between NO₂ concentrations (and not particles) in air and coarctation of the aorta [171].

The placenta has been little studied relative to PM in humans so far [172–174]. In the Generation R cohort in Rotterdam, PM₁₀ levels

in the 2 months prior to delivery were associated with a decrease in placental weight, and a proportionally similar decrease in birth weight, i.e. the placental to fetal weight ratio was not associated with PM₁₀. At delivery, PM₁₀ pregnancy averages were also associated changes in some markers of placental function, i.e., increased fetal soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) and decreased fetal (but not maternal) placental growth factor (PIGF). This was interpreted by the authors as being consistent with PM₁₀ inducing an anti-angiogenic state. PM₁₀ levels were also associated with a decreased pulsatility index in the umbilical artery, as assessed by second-trimester Doppler measurements [173].

Regarding immunological function at birth, a few studies have suggested that air pollution levels during pregnancy could be associated with changes in immunological markers assayed in cord blood, such as CD4+CD25% T-cell percentage [175], as well as Blymphocyte fraction [176].

More recent studies have also reported association between pregnancy air pollution levels and child health parameters, such as respiratory health or neurodevelopment [177–179]. Some studies show that children exposed to air pollution in utero exhibit increased risk of diabetes, obesity or cardiovascular disorders [180–182]. Air pollution has been proposed as a new paradigm in the origin of metabolic disorders. At this stage, it is too early to firmly conclude that such associations are driven by pregnancy exposures, and not childhood (postnatal) exposures, which generally correlate with prenatal exposures.

8. Discussion

The nanomaterial industry is growing rapidly and with it, application of NMs in consumer products. This increases the risk for exposure of pregnant women and thus the concern that maternal inhalation of airborne NP may adversely interfere with fetal and childhood development. This concern originates in part from epidemiological and experimental studies of ambient air pollution, which may contain considerable levels of particles. Although, differential effects of the particulate fraction versus other chemical and gaseous components of polluted air cannot be directly inferred from these studies and caution is needed in their interpretation with respect to the role of nanosized particles, their findings justifies a thorough assessment of the implications of manufactured NM exposure for possible adverse health outcomes following exposure early in life.

Overall, the scientific literature available to date, as summarized in this paper, indicates that current knowledge about the possible health risks of exposure to NP is very limited for reproductive and developmental outcomes. Systemically administered NP seem able to reach the placenta, cross the blood-placental barrier, accumulate in fetal tissues and cause adverse health effects on the pregnant dam and fetus. The limited data set on airway exposure to NP does however not indicate adverse effects on the classical gestational and litter parameters. Even if adverse effects of maternal exposure to NP may not be apparent in the embryo/fetus, they may manifest later in life. Thus several studies in the limited study database report that offspring organ function may be susceptible to perturbation by maternal inhalation exposure. This concerns the male reproductive, nervous, immune, and cardiovascular systems, of which the latter three are rarely subject to study in guideline studies. Female reproductive and metabolic function has hardly been studied.

Of note, in one study female mice were instilled with MWCNT prior to conception, at a dose level that would be expected to induce maternal lung inflammation that lasted throughout gestation. Central nervous and male reproductive function was not affected by this exposure [96], but a change in immune function was observed [130]. This could indicate that the immune system is more sensitive

to maternal chronic inflammation than male reproductive function and the investigated domains of central nervous system function.

The findings on NP are generally corroborated by observations in studies of air pollution, primarily from diesel engines, and DEP. It should however be noted that in contrast to findings for NP, several studies of DE and DEP observe that maternal inhalation hereof affects offspring weight, at birth, in lactation, and even in adulthood. Possibly, these effects do not owe to the particulate fraction in polluted air, but rather to associated chemicals, such as PAHs.

Studies in experimental animals offer several advantages, such as testing under controlled conditions, thereby precluding confounding factors that may occur in human studies of ambient air or diesel engine exhaust, as well as testing of NM prior to introduction in commercial products. The use of animal models in the study of developmental effects may be somewhat hampered by difference in placental structure between species. Ideally, model species should compare to humans and possess a hemochorial placenta, where the maternal blood is directly in contact with fetal trophoblastic tissue [48]. Mice and rats are the most used model animals in toxicology, and possess this type of placentation. Especially mice reach the definitive placental structure relatively later than humans, and furthermore have a much less invasive trophoblast [53]. In comparison, rabbits and guinea-pigs appear to be more similar to humans [183,184], and might therefore be preferable animal models in this respect. Early embryogenesis occurs before placentation is completed and studies of exposures early in pregnancy would therefore be expected to be little influenced by interspecies differences in placentation. When interpreting and designing animal studies for translation to human health, the longer gestation time in humans compared to many animal models (270 vs 20 days in rodents) might allow NP accumulation beyond a critical threshold for induction of direct effects in the human embryo/fetus. Such threshold (if any) is not currently known. Determination hereof probably represents one of the major issues in the future research on developmental toxicity. In this light, pulmonary exposure of pregnant animals with a gestation time comparable to that of humans might be of great help.

8.1. Testing strategy

A general tiered testing strategy for safety evaluations of NM was proposed by an expert working group of the International Life Sciences Institute (ILSI) Research Foundation/Risk Science Institute [185], presented at ECETOC's Workshop on testing strategies to establish the safety of NM. The first tier of this proposed screening strategy comprises short-term inhalation studies, and no specific developmental and reproductive toxicity studies. Potential effects on the reproductive system, placenta, and fetus are included in the second tier of the proposed screening strategy, recommending the use of protocols similar to the OECD Guideline 422 [26] (Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test) [185].

It is not explicitly mentioned which outcomes from the first tier studies would trigger initiation of second tier studies. The working group warned that potential oxidative stress and inflammatory responses elicited by NP in the respiratory tract may lead to release of mediators which may subsequently lead to indirect (secondary) effects in extra-pulmonary organ systems. If this is indeed the case, it could be argued that the observation of release of inflammatory mediators in acute and sub-acute inhalation studies in the first tier would trigger repeated dose toxicity studies that investigate the effects of nanomaterial exposure on reproductive organs and the developing fetus. This is all the more relevant, as both reproductive function and fetal development is indeed sensitive to oxidative stress and inflammation [8,12,13,82,83]. A testing strategy proposed by the OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials suggests that if reliable local, short-term and repeated dose toxicity studies do not indicate any biological effects and translocation, then systemic effects can be considered unlikely and further testing such as reproductive and developmental testing may not be necessary [6], while others are in favor of addressing developmental neurotoxicity as early as at the screening stage [5]. In the adult, lung inflammation has been shown to subside with time for many NMs [186]. Persistent effects may therefore be less likely. In the fetus these transient events may however induce persistent effects, i.e., what is a temporary phenomenon in the adult may have lifelong consequences for organ function in the offspring. Absence of translocation of particles to the systemic circulation ought therefore not to exclude developmental toxicity testing per se

As far as exposure routes other than inhalation are concerned, it is worth noting the work by Hong et al., who published a reproductive and developmental toxicity study on silver NP in rats according to the OECD test guideline TG422 Combined Repeated Dose Toxicity Study with Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test [26,162]. This guideline recommends oral administration of NP to both dams and sires from 14 days premating until 54 days postpartum at a dose range of 0-250 mg/kg. Although the paternal and maternal reproductive organs were examined, the major failure of following the TG was that it did not require examination of reproductive organs in the offspring, thus allowing for no conclusions to be drawn on the reproductive health of F1 animals following maternal NP exposure. The authors reported no significant changes in mating, fertility and pregnancy rates, nor any toxicity to pups even at the highest dose of 250 mg/kg [162]. It should be considered that the lack of toxicity may be related to poor bioavailability, as Loeschner et al. demonstrated orally administered silver NPs were excreted into feces after oral administration with little being absorbed [187]. This highlights the importance of selecting the most relevant exposure route and understanding the subsequent ADME profile in determining the true impact of parentally mediated exposure to NP. Whilst evidence to date suggests a growing interest in trying to understand the potential impact of maternal exposure on the health of the offspring, there is a strong call for comprehensive and harmonized assessment of both endocrine and reproductive effects in the safety evaluation of NM. Although sparse, the published studies on developmental toxicity of NP indicate that gestational and litter parameters are less of a concern than changes in offspring postnatal organ function. Some guidelines include functional testing of the offspring. Thus, offspring male reproductive parameters are included in generation guidelines (TG416 Two-Generation Reproduction Toxicity Study, TG443 Extended One Generation Reproductive Toxicity Study) [188,189]. Offspring neurofunction is described in TG 426 Developmental Neurotoxicity Study [190], and although it is not often used [191], it exists. Immune function undergoes some testing in the TG443 Extended One Generation Reproductive Toxicity Study [189], but this does not include evaluation of the potential for increased propensity to develop allergy, as observed in several studies of maternal exposure to particles. No protocols exist for study of developmental effects on the cardiovascular and metabolic systems.

More recently, the International Organization for Standardization (ISO) released a compilation of methods intended to aid the process of toxicological screening of engineered and manufactured NM prior to full-scale toxicological testing, analysis, and risk assessment. For developmental toxicity, the report states that ex vivo human placental perfusion models have proven useful in determining whether small molecules and NP are able to cross the placental barrier. This method can therefore help ascertain whether a given nanoparticle might put a developing fetus at risk [192]. This method is however only relevant in screening for the potential for direct effects on fetal development. Furthermore, placentas for use in the ex vivo human placental perfusion model are only available for study at the final stage of development of this organ and cannot be applied as a standard method, as placentas are not readily available. As emphasized above, the permeability of the placenta changes dramatically during pregnancy, and therefore little information can be gained by the ex vivo model on earlier stages of gestation. As described, there is increasing evidence that the placenta might be affected by NP. Addition of viability and inflammatory measures for the exposed placental tissue might provide important information. Furthermore, the embryonic stem cell test, rat limb bud test, and micromass test are suggested as partial replacements for in vivo developmental toxicity tests [192]. At present the applicability of these tests in nanoparticle reproductive toxicity needs to be established. The embryonic zebrafish model can be employed to rapidly provide information on the potential of nanomaterials ability to perturb embryonic development, manifested as death, morphological malformations or behavioral abnormalities. It should however be taken into account, that this model does not include a placenta and will therefore only be of use for the study of direct effects of NP, particularly regarding development and reproduction.

Combining the current knowledge and recommendations by various groups of experts reviewed above, it is clear that this area of nanotoxicology is very much in its infancy. Significant data gaps exist as to placental and embryo-fetal exposure as well for the potential for embryo-fetal toxicity, following maternal inhalation exposure to NP in pregnancy. In order to advance the field, we recommend making optimal use of the available models and assays, in assessment of critical aspects of toxicological hazard of NM (see Section 8.1.2 Recommendations for research). Importantly, attention should be given to the advantages and limitations of each available model. This approach will be able to supply insight into critical aspects of study design that can be employed for dedicated studies in experimental animals in order to support a well-underpinned human risk assessment of nanoparticle exposures. In the future, it should be considered to combine the available models in an integrated testing strategy.

8.1.1. Recommendations for components of a testing strategy

Clearly, a testing strategy for NP should be established, considering the increased production and application of nanomaterials. To suggest a specific testing strategy based on the sparse, current level of knowledge implies a risk of overlooking important aspects, as significant groundwork is still required. Some recommendations may however be deduced from the above review and discussion:

- Pregnancy and fetal development are sensitive to perturbation by inflammation, therefore particle induced inflammation may be a potential mediator of developmental toxicity. Systemic effects may therefore be likely even if particles do not seem to translocate from the lungs to the maternal systemic circulation. The observation of release of inflammatory mediators in first tier studies could potentially serve as a trigger for study of developmental toxicity.
- Changes in offspring organ function, such as effects on the male reproductive, immune, cardiovascular and neurological systems may be more of a concern than effects on gestational and litter parameters. Findings in a few studies furthermore indicate that also metabolic function and the ability to induce mutations in the male germ line is worth addressing. Of note, reproductive function in female offspring remains to be studied. Although guidelines may not have developed to guide experimental design for study of all relevant organ systems, functional testing ought to be an important priority in developmental toxicity testing of NP.

- The ex vivo human placental perfusion models may be useful in determining whether NP are able to cross the placental barrier, and thereby in screening for the potential for direct effects of NP on fetal development as well as for placental effects, in late pregnancy.
- Some in vitro tests might be useful in reproductive toxicity testing, but the applicability nanoparticle reproductive toxicity needs to be established. The embryonic zebrafish model may be of use for the study of direct effects of NP.
- Studies ought to design exposure to best mimic that of humans with respect to relevant species of particles, exposure route, levels and concentrations and duration, to be applied at relevant stages of pregnancy.

8.2. Specific research questions

To fill significant data gaps and provide a sound basis for development of a general testing strategy, several lines of research ought to be pursued. Importantly, state-of-the-art-methods must be applied. The level of knowledge that may be extracted from each study might increase if nano-toxicologists and reproductive scientists work more closely together in designing and interpreting studies, to achieve the optimal design for investigation of specific hypotheses and increase the understanding of, e.g., subtle changes in hormone regulation and developmental pathways that may lead to long term reproductive health concerns in the life after birth. Among others, the study of dose-effect is highly warranted.

One of the most relevant questions relate to NP-induced lung and systemic inflammation. Is inflammation the driving force for developmental effects? And does the inflammatory response differ between the pregnant and the non-pregnant state? If pregnancy enhances the inflammogenic potential of NP and inflammation is the driving force for developmental effects, this may imply that pregnant women will need a higher degree of protection than predicted from non-pregnant models. Along the same line of thinking, it might be important to know how the developmental trajectory is affected if exposure to NP occurs on top of existing states of low-grade chronic inflammation, encountered in for example asthma and obesity, compared to exposure in a non-inflammatory state. This is especially important because inflammation seems to enhance transfer of particles across the placenta [70].

There are some indications that the placenta may play a central role in the mediation of developmental toxicity NP, but this remains to be studied for administration of particles via the airways, as does translocation of particles across the placenta.

To enable grouping of particles for risk assessment, it seems pertinent to study patterns of effect for different NP. This would imply the use of comparable study designs with respect to exposure regimens, and outcome assessment. A partial step would be to apply accepted guidelines, e.g., from the OECD or EPA as has been suggested for developmental neurotoxicity [5]. This might also help delineating the relative contribution of particles compared to associated chemicals for ambient air pollution particles.

The review identifies several organ systems to be potentially sensitive to maternal inhalation of particles during pregnancy. It is obviously not feasible to study all for a larger number of particles. One point for departure could therefore be to identify the organ systems and specific outcomes that may be most sensitive to perturbation by developmental exposure to particles. These could then be studied for a larger number of particles.

Many of the described studies use intratracheal instillation to deliver the NP. This does however imply a high dose rate. It seems highly warranted to describe the importance of dose rate and the potential underlying differences for induction of inflammation and, potentially, translocation of particles across the lung and placenta.

9. Conclusion

The available published data are as yet too limited for definitive conclusions. Although the available database on NP describes several organ systems in the offspring to be potentially sensitive to maternal inhalation of particles, large uncertainties exist about the implications of such exposures for embryo-fetal development as well as for possible long term health effects later in life. Importantly, indirect adverse developmental effects may occur secondarily to maternal inflammatory responses. Epidemiological studies available to date have shown associations between exposure to particles as they occur in ambient air and adverse health effects in the offspring. These studies do however not allow for definitive statements as to the relevance hereof for developmental toxicity of NP at the present time. The emerging picture suggests that embryo-fetal exposure to NP after exposure via relevant routes (inhalation and oral) may be limited. However, exposure of the conceptus has been shown to occur in experimental studies and translocation from the maternal lungs to the fetus has yet to be studied. Overall, experimental studies indicate that adverse health effects of such exposures cannot be excluded, but at present the potential for hazard has not been characterized. We conclude that further dedicated research on systemic exposure, toxicity mechanisms specific for particulate matter, exposure and effect relationships, is needed. Several gaps remains to be filled before a testing strategy for NP can be established on a sound scientific basis. It is without doubt that a testing strategy is needed, particularly considering the increased production and application of nanomaterials and related consumer products.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflict of interest.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgements

The authors want to thank financial contribution from the Risks of Nanotechnology Knowledge and Information Center (KIR nano) in the Netherlands http://www.rivm.nl/en/Topics/ N/Nanotechnology/Risks_of_Nanotechnology_Knowledge_and_

Information_Centre_KIR_nano) (FC, WHdJ), the Italian national project "Impact of engineered nanoparticles on reproductive health" (RF-2009-1536665) funded by the Italian Ministry of Health and COST Action MODENA (LC, AP), the FP7 Projects NanoReg (grant 310584) and MARINA (grant agreement 263215) (BLR, AP, LC and GRH), the Danish Center for Nanosafety (http:// nanosafety.dk/), grant 20110092173-3 from the Danish Working Environment Research Foundation (KSH, PJ, UV, JSH), the French National Research Agency project EPAPP "Effects of atmospheric pollution on placental function an post-natal development" (ANR-13-CESA-0011) and the European Research Council starting grant E-DOHaD (N°311765) (PC-P, RS, FC, SV, DR-R, AT). PC-P, DR-R, AT and SV are members of COST Actions FA0702 GEMINI "Maternal interaction with gametes and embryo", FA1201 EPICONCEPT "Epigenetics and periconceptial environment" and BM1308 "Sharing advances on large animal models (SALAAM)".

References

- Kaluza S, Balderhaar J, Orthen B, Honnert B, Jankovska E, Pietrowski P, et al. Workplace exposures to nanoparticles. Brussels, Belgium: European Agency for Safety and Health at Work (EU-OSHA); 2009.
- [2] Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee. Second Regulatory Review on Nanomaterials. COM(2012) 572 final, COM(2012) 572 final, European Commission, 2012.
- [3] 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.
- [4] Hougaard KS, Campagnolo L. Reproductive toxicity of engineered nanoparticles. In: Fadeel B, Pietroiusti A, Shvedova AA, editors. Adverse effects of engineered nanoparticles. Elsevier; 2012. p. 225–48.
- [5] Powers CM, Bale AS, Kraft AD, Makris SL, Trecki J, Cowden J, et al. Developmental neurotoxicity of engineered nanomaterials: identifying research needs to support human health risk assessment. Toxicol Sci 2013;134(2):225–42.
- [6] Klein CL, Wiench K, Wiemann M, Ma-Hock L, van RB, Landsiedel R. Hazard identification of inhaled nanomaterials: making use of short-term inhalation studies. Arch Toxicol 2012;86(7):1137–51.
- [7] Pietroiusti A, Campagnolo L, Fadeel B. Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers. Small 2013;9(9–10):1557–72.
- [8] Hougaard KS, Fadeel B, Gulumian M, Kagan VE, Savolainen K. Developmental toxicity of engineered nanoparticles. In: Gupta R, editor. Reproductive and developmental toxicology. San Diego: Academic Press/Elsevier; 2011. p. 269–90.
- [9] Hougaard KS, Jackson P, Jensen KA, Sloth JJ, Loschner K, Larsen EH, et al. Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. Part Fibre Toxicol 2010;7:16.
- [10] Jackson P, Hougaard KS, Boisen AM, Jacobsen NR, Jensen KA, Moller P, et al. Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring. Nanotoxicology 2011;6(5):484–500.
- [11] Moller P, Jacobsen NR, Folkmann JK, Danielsen PH, Mikkelsen L, Hemmingsen JG, et al. Role of oxidative damage in toxicity of particulates. Free Radic Res 2010;44(1):1–46.
- [12] Wells PG, Bhuller Y, Chen CS, Jeng W, Kasapinovic S, Kennedy JC, et al. Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. Toxicol Appl Pharmacol 2005;207(2 Suppl.):354–66.
- [13] Ratnayake U, Quinn T, Walker DW, Dickinson H. Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness. Front Neurosci 2013;7:180.
- [14] Karsch FJ, Battaglia DF, Breen KM, Debus N, Harris TG. Mechanisms for ovarian cycle disruption by immune/inflammatory stress. Stress 2002;5(2):101–12.
- [15] Iavicoli I, Fontana L, Leso V, Bergamaschi A. The effects of nanomaterials as endocrine disruptors. Int J Mol Sci 2013;14(8):16732–801.
- [16] Sun J, Zhang Q, Wang Z, Yan B. Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. Int J Mol Sci 2013;14(5):9319–37.
 [17] Shah PS. Balkhair T. Air pollution and birth outcomes: a systematic review.
- Environ Int 2011;37(2):498–516.
 [18] Kannan S, Misra DP, Dvonch JT, Krishnakumar A. Exposures to airborne
- [18] Kalinan S, Mista DF, Dvolich JF, Krisinakumar A. Expositios to altroome particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential. Cien Saude Colet 2007;12(6):1591–602.
- [19] Hougaard KS, Jensen KA, Nordly P, Taxvig C, Vogel U, Saber AT, et al. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. Part Fibre Toxicol 2008;5:3.
- [20] Ema M, Naya M, Horimoto M, Kato H. Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. Reprod Toxicol 2013;42:1–17.
- [21] European Commission. Commission recommendation of 18 October on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). Official Journal of the European Union 2011;L 275:38–40.
- [22] European Commission Enterprise and Industry. Nanomaterials. European Commission. 2-2-2015. http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/ reach/nanomaterials/index_en.htm
- [23] Prutner W. Hazard and risk assessment of teratogenic chemicals under REACH. Methods Mol Biol 2013;947:517–43.
- [24] Hankin S, Peters S, Poland CA, Foss Hansen S, Holmquist J, Ross B, et al. Specific advice on fulfilling information requirements for nanomaterials under REACH (RIP-oN 2). Final project report. RNC/RIP-oN2/FPR/1/FINAL. 2011.
- [25] ECHA. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Appendix R7-1. Recommendations for nanomaterials applicable to chapter R7a Endpoint specific guidance. ECHA-12-G-03-ENG. Helsinki, Finland: European Chemicals Agency; 2012.
- [26] OECD. OECD Guideline for testing of chemicals. 422. Combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test. OECD; 1996.
- [27] Lawson CC, Grajewski B, Daston GP, Frazier LM, Lynch D, McDiarmid M, et al. Workgroup report: Implementing a national occupational reproductive research agenda – decade one and beyond. Environ Health Perspect 2006;114(3):435–41.
- [28] U.S. Food and Drug Administration. Nanotechnology Fact Sheet. U.S. Food and Drug Administration; 2015 http://www.fda.gov/ScienceResearch/ SpecialTopics/Nanotechnology/ucm402230.htm

- [29] U.S. Department of Health and Human Services. Safety of nanomaterials in cosmetic products. Guidance for industry. U.S. Food and Drug Administration; 2014 http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceRegulation/ GuidanceDocuments/ucm300886.htm
- [30] OECD. OECD's Working Party on Nanotechnology. OECD; 2015 http://www. oecd.org/sti/sci-tech/oecdworkingpartyonnanotechnology.htm
- [31] Stone V, Pozzi-Mucelli S, Tran L, Aschberger K, Sabella S, Vogel U, et al. ITS-NANO – prioritising nanosafety research to develop a stakeholder driven intelligent testing strategy. Part Fibre Toxicol 2014;11:9.
- [32] Arts JH, Hadi M, Keene AM, Kreiling R, Lyon D, Maier M, et al. A critical appraisal of existing concepts for the grouping of nanomaterials. Regul Toxicol Pharmacol 2014;70(2):492–506.
- [33] van der Jagt K, Munn S, Torslov J, de Bruijn J. Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. Report EUR21405. European Commission Joint Research Centre; 2004.
- [34] Cassee FR, Muijser H, Duistermaat E, Freijer JJ, Geerse KB, Marijnissen JC, et al. Particle size-dependent total mass deposition in lungs determines inhalation toxicity of cadmium chloride aerosols in rats. Application of a multiple path dosimetry model. Arch Toxicol 2002;76(5-6):277–86.
- [35] ICRP. Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission of Radiological Protection, 66. ICRP publication; 1994.
- [36] Kreyling WG, Hirn S, Moller W, Schleh C, Wenk A, Celik G, et al. Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. ACS Nano 2014;8(1):222–33.
- [37] Gulson B, McCall M, Korsch M, Gomez L, Casey P, Oytam Y, et al. Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. Toxicol Sci 2010;118(1):140–9.
- [38] Krystek P, Tentschert J, Nia Y, Trouiller B, Noel L, Goetz ME, et al. Method development and inter-laboratory comparison about the determination of titanium from titanium dioxide nanoparticles in tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 2014;406(16): 3853–61.
- [39] de Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. Biomaterials 2008;29(12):1912–9.
- [40] Lankveld DP, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Troost-de JA, Noorlander CW, et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. Biomaterials 2010;31(32):8350–61.
- [41] Geraets L, Oomen AG, Krystek P, Jacobsen NR, Wallin H, Laurentie M, et al. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats. Part Fibre Toxicol 2014;11:30.
- [42] Hirn S, Semmler-Behnke M, Schleh C, Wenk A, Lipka J, Schaffler M, et al. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. Eur J Pharm Biopharm 2011;77(3):407–16.
- [43] Semmler-Behnke M, Kreyling WG, Lipka J, Fertsch S, Wenk A, Takenaka S, et al. Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. Small 2008;4(12):2108–11.
- [44] Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(7):2050–5.
- [45] Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Aberg C, Dawson KA, Salvati A. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. ACS Nano 2012;6(7):5845–57.
- [46] Lankveld DP, Rayavarapu RG, Krystek P, Oomen AG, Verharen HW, van Leeuwen TG, et al. Blood clearance and tissue distribution of PEGylated and non-PEGylated gold nanorods after intravenous administration in rats. Nanomedicine (London) 2011;6(2):339–49.
- [47] Yang H, Sun C, Fan Z, Tian X, Yan L, Du L, et al. Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. Sci Rep 2012;2:847.
- [48] Chavatte-Palmer P, Guillomot M. Comparative implantation and placentation. Gynecol Obstet Invest 2007;64(3):166–74.
- [49] Wooding F, Burton G. Implantation, maternofetal exchange and vascular relationships. Comparative placentation; structures, functions and evolution. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2008. p. 47–80.
- [50] Carter AM. Evolution of placental function in mammals: the molecular basis of gas and nutrient transfer, hormone secretion, and immune responses. Physiol Rev 2012;92(4):1543–76.
- [51] Guibourdenche J, Fournier T, Malassine A, Evain-Brion D. Development and hormonal functions of the human placenta. Folia Histochem Cytobiol 2009;47(5):S35–40.
- [52] Tarrade A, Chavatte-Palmer P, Guillomot M, Camous S, Evian-Brion D. Le Placenta. In: Chastant-Maillard S, Saint-Dizier M, editors. Reproduction chez l'homme et l'animal. INRA; 2014. p. 367–94.
- [53] Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. Hum Reprod Update 2003;9(6):531–9.
- [54] Carter AM, Enders AC, Jones CJ, Mess A, Pfarrer C, Pijnenborg R, et al. Comparative placentation and animal models: patterns of trophoblast invasion – a workshop report. Placenta 2006;27(Suppl. A):S30–3.
- [55] Rubinchik-Stern M, Eyal S. Drug interactions at the human placenta: what is the evidence? Front Pharmacol 2012;3:126.

- [56] Cartwright L, Poulsen MS, Nielsen HM, Pojana G, Knudsen LE, Saunders M, et al. In vitro placental model optimization for nanoparticle transport studies. Int J Nanomed 2012;7:497–510.
- [57] Ali H, Kalashnikova I, White MA, Sherman M, Rytting E. Preparation, characterization, and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental in vitro model. Int J Pharm 2013;454(1): 149–57.
- [58] Poulsen MS, Mose T, Leth ML, Mathiesen L, Ehlert KL, Rytting E. Kinetics of silica nanoparticles in the human placenta. Nanotoxicology 2015;9: 79–86.
- [59] Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, Diener L, et al. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. Environ Health Perspect 2010;118(3):432–6.
- [60] Sumner SC, Fennell TR, Snyder RW, Taylor GF, Lewin AH. Distribution of carbon-14 labeled C60 ([¹⁴C]C60) in the pregnant and in the lactating dam and the effect of C60 exposure on the biochemical profile of urine. J Appl Toxicol 2010;30(4):354–60.
- [61] Qi W, Bi J, Zhang X, Wang J, Wang J, Liu P, et al. Damaging effects of multiwalled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. Sci Rep 2014;4:4352.
- [62] Chu M, Wu Q, Yang H, Yuan R, Hou S, Yang Y, et al. Transfer of quantum dots from pregnant mice to pups across the placental barrier. Small 2010;6(5):670–8.
- [63] Blum JL, Xiong JQ, Hoffman C, Zelikoff JT. Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth. Toxicol Sci 2012;26(2):478–86.
- [64] Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. Nat Nanotechnol 2011;6(5):321–8.
- [65] Rattanapinyopituk K, Shimada A, Morita T, Sakurai M, Asano A, Hasegawa T, et al. Demonstration of the clathrin- and caveolin-mediated endocytosis at the maternal-fetal barrier in mouse placenta after intravenous administration of gold nanoparticles. J Vet Med Sci 2014;76(3):377–87.
- [66] Di Bona KR, Xu Y, Ramirez PA, DeLaine J, Parker C, Bao Y, et al. Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice. Reprod Toxicol 2014;50:36–42.
- [67] Grafmuller S, Manser P, Krug HF, Wick P, von MU. Determination of the transport rate of xenobiotics and nanomaterials across the placenta using the ex vivo human placental perfusion model. J Vis Exp 2013;76:e50401.
- [68] Correia CS, Walker L, Paul K, Saunders M. The toxicity, transport and uptake of nanoparticles in the in vitro BeWo b30 placental cell barrier model used within NanoTEST. Nanotoxicology 2013;9:66–78.
- [69] Mathiesen L, Morck TA, Zuri G, Andersen MH, Pehrson C, Frederiksen M, et al. Modelling of human transplacental transport as performed in Copenhagen, Denmark. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2014;115:93–100.
- [70] Tian X, Zhu M, Du L, Wang J, Fan Z, Liu J, et al. Intrauterine inflammation increases materno-fetal transfer of gold nanoparticles in a size-dependent manner in murine pregnancy. Small 2013;9(14):2432–9.
 [71] Shvedova AA, Pietroiusti A, Fadeel B, Kagan VE. Mechanisms of carbon
- [71] Shvedova AA, Pietroiusti A, Fadeel B, Kagan VE. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol 2012;261(2):121–33.
- [72] Erdely A, Liston A, Salmen-Muniz R, Hulderman T, Young SH, Zeidler-Erdely PC, et al. Identification of systemic markers from a pulmonary carbon nanotube exposure. J Occup Environ Med 2011;53(6 Suppl.):S80–6.
- [73] Saber AT, Lamson JS, Jacobsen NR, Ravn-Haren G, Hougaard KS, Nyendi AN, et al. Particle-induced pulmonary acute phase response correlates with neutrophil influx linking inhaled particles and cardiovascular risk. PLOS ONE 2013;8(7):e69020.
- [74] Koga K, Izumi G, Mor G, Fujii T, Osuga Y. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy complications. Am J Reprod Immunol 2014;72(2):192–205.
- [75] Zhao C, Liao J, Chu W, Wang S, Yang T, Tao Y, et al. Involvement of TLR2 and TLR4 and Th1/Th2 shift in inflammatory responses induced by fine ambient particulate matter in mice. Inhal Toxicol 2012;24(13):918–27.
- [76] Pietroiusti A, Massimiani M, Fenoglio I, Colonna M, Valentini F, Palleschi G, et al. Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect Mammalian embryonic development. ACS Nano 2011;5(6):4624–33.
- [77] Barker DJ. In utero programming of chronic disease. Clin Sci (Colch) 1998;95(2):115–28.
- [78] Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nat Rev Genet 2007;8(4):253–62.
- [79] Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V. Epigenetics and pesticides. Toxicology 2013;307:35-41.
- [80] Barker DJ. The developmental origins of adult disease. J Am Coll Nutr 2004;23(6 Suppl.):5885–955.
- [81] Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 2009;3(1):73–80.
- [82] Dennery PA. Oxidative stress in development: nature or nurture? Free Radic Biol Med 2010;49(7):1147–51.
- [83] Hansen JM, Harris C. Redox control of teratogenesis. Reprod Toxicol 2013;35:165-79.
- [84] Hodyl NA, Stark MJ, Osei-Kumah A, Clifton VL. Prenatal programming of the innate immune response following in utero exposure to inflammation: a sexually dimorphic process? Expert Rev Clin Immunol 2011;7(5):579–92.

- [85] Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, MacNee W, Renwick L, et al. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. J Aerosol Med 2002;15(2):213–20.
- [86] Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kimura H, Kawashima A, Mizukami H, et al. Nanosilica-induced placental inflammation and pregnancy complications: different roles of the inflammasome components NLRP3 and ASC. Nanotoxicology 2014;11:1–14.
- [87] Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A. Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice. J Toxicol Sci 2012;37(1):81–9.
- [88] Lim KJ, Odukoya OA, Li TC, Cooke ID. Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage. Hum Reprod Update 1996;2(6):469–81.
- [89] de Melo JO, Soto SF, Katayama IA, Wenceslau CF, Pires AG, Veras MM, et al. Inhalation of fine particulate matter during pregnancy increased IL-4 cytokine levels in the fetal portion of the placenta. Toxicol Lett 2015;232(2): 475–80.
- [90] Sood A, Salih S, Roh D, Lacharme-Lora L, Parry M, Hardiman B, et al. Signalling of DNA damage and cytokines across cell barriers exposed to nanoparticles depends on barrier thickness. Nat Nanotechnol 2011;6(12):824–33.
- [91] Hsieh MS, Shiao NH, Chan WH. Cytotoxic effects of CdSe quantum dots on maturation of mouse oocytes, fertilization, and fetal development. Int J Mol Sci 2009;10(5):2122–35.
- [92] Halappanavar S, Jackson P, Williams A, Jensen KA, Hougaard KS, Vogel U, et al. Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study. Environ Mol Mutagen 2011;52(6):425–39.
- [93] Jackson P, Halappanavar S, Hougaard KS, Williams A, Madsen AM, Lamson JS, et al. Maternal inhalation of surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan) in C57BL/6 mice: effects in prenatally exposed offspring on hepatic DNA damage and gene expression. Nanotoxicology 2013;7:85–96.
- [94] Jackson P, Vogel U, Wallin H, Hougaard KS. Prenatal exposure to carbon black (Printex 90): effects on sexual development and neurofunction. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2011;109(6):434–7.
- [95] Jackson P, Hougaard KS, Vogel U, Wu D, Casavant L, Williams A, et al. Exposure of pregnant mice to carbon black by intratracheal instillation: toxicogenomic effects in dams and offspring. Mutat Res 2012;745(1–2):73–83.
- [96] Hougaard KS, Jackson P, Kyjovska ZO, Birkedal RK, De Temmerman PJ, Brunelli A, et al. Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. Reprod Toxicol 2013;41:86–97.
- [97] Ono N, Oshio S, Niwata Y, Yoshida S, Tsukue N, Sugawara I, et al. Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis. Inhal Toxicol 2007;19(3):275–81.
- [98] Umezawa M, Sakata C, Tanaka N, Tabata M, Takeda K, Ihara T, et al. Pathological study for the effects of in utero and postnatal exposure to diesel exhaust on a rat endometriosis model. J Toxicol Sci 2011;36(4):493–8.
- [99] Weldy CS, Liu Y, Liggitt HD, Chin MT. In utero exposure to diesel exhaust air pollution promotes adverse intrauterine conditions, resulting in weight gain, altered blood pressure, and increased susceptibility to heart failure in adult mice. PLOS ONE 2014;9(2):e88582.
- [100] Fujimoto A, Tsukue N, Watanabe M, Sugawara I, Yanagisawa R, Takano H, et al. Diesel exhaust affects immunological action in the placentas of mice. Environ Toxicol 2005;20(4):431–40.
- [101] Watanabe N, Kurita M. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. Environ Health Perspect 2001;109(2):111–9.
- [102] Li C, Li X, Suzuki AK, Zhang Y, Fujitani Y, Nagaoka K, et al. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. J Reprod Dev 2013;59(2):145–50.
- [103] Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. Toxicol Lett 2005;155(1):51–8.
- [104] Watanabe N, Ohsawa M. Elevated serum immunoglobulin E to Cryptomeria japonica pollen in rats exposed to diesel exhaust during fetal and neonatal periods. BMC Pregnancy Childbirth 2002;2(1):2–11.
- [105] Pepelko WE, Peirano WB. Health effects of exposure to diesel engine emissions: a summary of animal studies conducted by the US Environmental Protection Agency's Health Effects Research Laboratories at Cincinnati, Ohio. J Am Coll Toxicol 1983;2(4):253–306.
- [106] Tsukue N, Tsubone H, Suzuki AK. Diesel exhaust affects the abnormal delivery in pregnant mice and the growth of their young. Inhal Toxicol 2002;14(6):635–51.
- [107] International Programme for Chemical Safety. Global Assessment of the Stateof-the-Science for Endocrine Disruptors. Geneva: World Health Organisation; 2002.
- [108] Tsukue N, Watanabe M, Kumamoto T, Takano H, Takeda K. Perinatal exposure to diesel exhaust affects gene expression in mouse cerebrum. Arch Toxicol 2009;83(11):985–1000.
- [109] Li C, Taneda S, Taya K, Watanabe G, Li X, Fujitani Y, et al. Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats. Toxicol Lett 2009;185(1):1–8.
- [110] Tang-Peronard JL, Andersen HR, Jensen TK, Heitmann BL. Endocrinedisrupting chemicals and obesity development in humans: a review. Obes Rev 2011;12(8):622–36.
- [111] Janesick A, Blumberg B. Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. Int J Androl 2012;35(3):437–48.
- [112] Cottrell EC, Ozanne SE. Developmental programming of energy balance and the metabolic syndrome. Proc Nutr Soc 2007;66(2):198–206.

- [113] Onoda A, Umezawa M, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. Effects of maternal exposure to ultrafine carbon black on brain perivascular macrophages and surrounding astrocytes in offspring mice. PLOS ONE 2014;9(4): e94336.
- [114] Sugamata M, Ihara T, Takano H, Oshio S, Takeda K. Maternal diesel exhaust exposure damages newborn murine brains. J Health Sci 2006;52(1):82–4.
- [115] Sugamata M, Ihara T, Sugamata M, Takeda K. Maternal exposure to diesel exhaust leads to pathological similarity of autism in newborns. J Health Sci 2006;52(4):486–8.
- [116] Yokota S, Mizuo K, Moriya N, Oshio S, Sugawara I, Takeda K. Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. Neurosci Lett 2009;449(1):38–41.
- [117] Suzuki T, Oshio S, Iwata M, Saburi H, Odagiri T, Udagawa T, et al. In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. Part Fibre Toxicol 2010;7:7.
- [118] Yokota S, Moriya N, Iwata M, Umezawa M, Oshio S, Takeda K. Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. J Toxicol Sci 2013;38(1):13–23.
- [119] Thirtamara RK, Doherty-Lyons S, Bolden C, Willis D, Hoffman C, Zelikoff J, et al. Prenatal and early-life exposure to high-level diesel exhaust particles leads to increased locomotor activity and repetitive behaviors in mice. Autism Res 2013;6(4):248–57.
- [120] Bolton JL, Smith SH, Huff NC, Gilmour MI, Foster WM, Auten RL, et al. Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. FASEB J 2012;26(11):4743-54.
- [121] Davis DA, Bortolato M, Godar SC, Sander TK, Iwata N, Pakbin P, et al. Prenatal exposure to urban air nanoparticles in mice causes altered neuronal differentiation and depression-like responses. PLOS ONE 2013;8(5):e64128.
- [122] Yoshida S, Hiyoshi K, Oshio S, Takano H, Takeda K, Ichinose T. Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring. Fertil Steril 2009;93(5):1695–9.
- [123] Kyjovska ZO, Boisen AM, Jackson P, Wallin H, Vogel U, Hougaard KS. Daily sperm production: application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice. Reprod Toxicol 2013;36:88–97.
- [124] Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, et al. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. J Health Sci 2009;55(1):95–102.
- [125] Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. Development 2007;134(19):3401–11.
- [126] Childs AJ, Cowan G, Kinnell HL, Anderson RA, Saunders PT. Retinoic acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. PLoS ONE 2011;6(6):e20249.
- [127] Jo E, Seo G, Kwon JT, Lee M, Lee B, Eom I, et al. Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats. J Toxicol Sci 2013;38(4):525–30.
- [128] Hemmingsen JG, Hougaard KS, Talsness C, Wellejus A, Loft S, Wallin H, et al. Prenatal exposure to diesel exhaust particles and effect on the male reproductive system in mice. Toxicology 2009;264(1–2):61–8.
- [129] El-Sayed YS, Shimizu R, Onoda A, Takeda K, Umezawa M. Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. Toxicology 2015;327:53–61.
- [130] Hansen JS, Johansson HKL, Vogel U, Larsen ST, Hougaard KS. Maternal exposure to carbon nanotubes and effects on allergy in offspring. In: 7th meeting of the immunotoxicology and chemical allergy section (ITCASS). 2012.
- [131] Fedulov AV, Leme A, Yang Z, Dahl M, Lim R, Mariani TJ, et al. Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. Am J Respir Cell Mol Biol 2008;38(1):57–67.
- [132] Zhang Y, Mikhaylova L, Kobzik L, Fedulov AV. Estrogen-mediated impairment of macrophageal uptake of environmental TiO particles to explain inflammatory effect of TiO on airways during pregnancy. J Immunotoxicol 2015;12(1):81–91.
- [133] Manners S, Alam R, Schwartz DA, Gorska MM. A mouse model links asthma susceptibility to prenatal exposure to diesel exhaust. J Allergy Clin Immunol 2014;134(1):63–72.
- [134] Corson L, Zhu H, Quan C, Grunig G, Ballaney M, Jin X, et al. Prenatal allergen and diesel exhaust exposure and their effects on allergy in adult offspring mice. Allergy Asthma Clin Immunol 2010;6(1):7.
- [135] Sharkhuu T, Doerfler DL, Krantz QT, Luebke RW, Linak WP, Gilmour MI. Effects of prenatal diesel exhaust inhalation on pulmonary inflammation and development of specific immune responses. Toxicol Lett 2010;196(1):12–20.
- [136] Hong X, Liu C, Chen X, Song Y, Wang Q, Wang P, et al. Maternal exposure to airborne particulate matter causes postnatal immunological dysfunction in mice offspring. Toxicology 2013;306:59–67.
- [137] Auten RL, Potts EN, Mason SN, Fischer B, Huang Y, Foster WM. Maternal exposure to particulate matter increases postnatal ozone-induced airway hyperreactivity in juvenile mice. Am J Respir Crit Care Med 2009;180(12):1218–26.
- [138] Auten RL, Gilmour MI, Krantz QT, Potts EN, Mason SN, Foster WM. Maternal diesel inhalation increases airway hyperreactivity in ozone-exposed offspring. Am J Respir Cell Mol Biol 2012;46(4):454–60.
- [139] Hansen JS, Alberg T, Rasmussen H, Lovik M, Nygaard UC. Determinants of experimental allergic responses: interactions between allergen dose, sex and age. Scand J Immunol 2011;10:3083.

- [140] Zhou D, Pan YX. Pathophysiological basis for compromised health beyond generations: role of maternal high-fat diet and low-grade chronic inflammation. J Nutr Biochem 2015;26(1):1–8.
- [141] Stapleton PA, Minarchick VC, Yi J, Engels K, McBride CR, Nurkiewicz TR. Maternal engineered nanomaterial exposure and fetal microvascular function: does the Barker hypothesis apply? Am J Obstet Gynecol 2013;209(3):227–311.
- [142] Stapleton PA, Nichols CE, Yi J, McBride CR, Minarchick VC, Shepherd DL, et al. Microvascular and mitochondrial dysfunction in the female F1 generation after gestational TiO nanoparticle exposure. Nanotoxicology 2012;9:5.
- [143] Umezawa M, Kudo S, Yanagita S, Shinkai Y, Niki R, Oyabu T, et al. Maternal exposure to carbon black nanoparticle increases collagen type VIII expression in the kidney of offspring. J Toxicol Sci 2011;36(4):461–8.
 [144] Damaceno-Rodrigues NR, Veras MM, Negri EM, Zanchi AC, Rhoden CR,
- [144] Damaceno-Rodrigues NR, Veras MM, Negri EM, Zanchi AC, Rhoden CR, Saldiva PH, et al. Effect of pre- and postnatal exposure to urban air pollution on myocardial lipid peroxidation levels in adult mice. Inhal Toxicol 2009;21(13):1129–37.
- [145] Weldy CS, Liu Y, Chang YC, Medvedev IO, Fox JR, Larson TV, et al. In utero and early life exposure to diesel exhaust air pollution increases adult susceptibility to heart failure in mice. Part Fibre Toxicol 2013;10(1):59.
- [146] Gorr MW, Velten M, Nelin TD, Youtz DJ, Sun Q, Wold LE. Early life exposure to air pollution induces adult cardiac dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2014;307(9):H1353–60.
- [147] Bourdon JA, Saber AT, Jacobsen NR, Jensen KA, Madsen AM, Lamson JS, et al. Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver. Part Fibre Toxicol 2012;9(1):5.
- [148] Aston KI, Carrell DT. Emerging evidence for the role of genomic instability in male factor infertility. Syst Biol Reprod Med 2012;58(2):71–80.
- [149] Boisen AM, Shipley T, Jackson P, Hougaard KS, Wallin H, Yauk CL, et al. NanoTiO₂ (UV-Titan) does not induce ESTR mutations in the germline of prenatally exposed female mice. Part Fibre Toxicol 2012;9:19.
- [150] Adler ID, Carere A, Eichenlaub-Ritter U, Pacchierotti F. Gender differences in the induction of chromosomal aberrations and gene mutations in rodent germ cells. Environ Res 2007;104(1):37–45.
- [151] Boisen AM, Shipley T, Jackson P, Wallin H, Nellemann C, Vogel U, et al. In utero exposure to nanosized carbon black (Printex90) does not induce tandem repeat mutations in female murine germ cells. Reprod Toxicol 2013;41:45–8.
- [152] Ritz C, Ruminski W, Hougaard KS, Wallin H, Vogel U, Yauk CL. Germline mutation rates in mice following in utero exposure to diesel exhaust particles by maternal inhalation. Mutat Res 2011;712(1–2):55–8.
- [153] Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, et al. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105(2):605–10.
- [154] Somers CM, Yauk C, White PA, Parfett CL, Quinn JS. Air pollution induces heritable DNA mutations. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99(25):15904–7.
- [155] Austin CA, Umbreit TH, Brown KM, Barber DS, Dair BJ, Francke-Carroll S, et al. Distribution of silver nanoparticles in pregnant mice and developing embryos. Nanotoxicology 2012;6:912–22.
- [156] Maeda-Mamiya R, Noiri E, Isobe H, Nakanishi W, Okamoto K, Doi K, et al. In vivo gene delivery by cationic tetraamino fullerene. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107(12):5339-44.
- [157] Campagnolo L, Massimiani M, Palmieri G, Bernardini R, Sacchetti C, Bergamaschi A, et al. Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice. Part Fibre Toxicol 2013;10(1):21.
- [158] Huang X, Zhang F, Sun X, Choi KY, Niu G, Zhang G, et al. The genotypedependent influence of functionalized multiwalled carbon nanotubes on fetal development. Biomaterials 2014;35(2):856–65.
- [159] Philbrook NA, Winn LM, Afrooz AR, Saleh NB, Walker VK. The effect of TiO₂ and Ag nanoparticles on reproduction and development of *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. Toxicol Appl Pharmacol 2011;257(3):429–36.
- [160] Mwilu SK, El Badawy AM, Bradham K, Nelson C, Thomas D, Scheckel KG, et al. Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: effects of particle size and surface chemistry. Sci Total Environ 2013;447:90–8.
- [161] Philbrook NA, Walker VK, Afrooz AR, Saleh NB, Winn LM. Investigating the effects of functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in Drosophila melanogaster and CD-1 mice. Reprod Toxicol 2011;32(4):442–8.
- [162] Hong JS, Kim S, Lee SH, Jo E, Lee B, Yoon J, et al. Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. Nanotoxicology 2014;8(4):349–62.
- [163] Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, Vogel U, Doering P, Larsen A, et al. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. Part Fibre Toxicol 2007;4:10.
 [164] Tsuchiya T, Oguri I, Yamakoshi YN, Miyata N. Novel harmful effects
- [164] Tsuchiya T, Oguri I, Yamakoshi YN, Miyata N. Novel harmful effects of [60]fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo. FEBS Lett 1996;393(1):139–45.
- [165] Gehring U, Tamburic L, Sbihi H, Davies HW, Brauer M. Impact of noise and air pollution on pregnancy outcomes. Epidemiology 2014;25(3):351–8.
- [166] Dadvand P, Parker J, Bell ML, Bonzini M, Brauer M, Darrow LA, et al. Maternal exposure to particulate air pollution and term birth weight: a multi-country evaluation of effect and heterogeneity. Environ Health Perspect 2013;121(3):267–373.
- [167] Pedersen M, Stayner L, Slama R, Sorensen M, Figueras F, Nieuwenhuijsen MJ, et al. Ambient air pollution and pregnancy-induced hypertensive disorders: a systematic review and meta-analysis. Hypertension 2014;64(3):494–500.

- [168] Yorifuji T, Naruse H, Kashima S, Murakoshi T, Doi H. Residential proximity to major roads and obstetrical complications. Sci Total Environ 2015;508:188–92.
- [169] Slama R, Ballester F, Casas M, Cordier S, Eggesbo M, Iniguez C, et al. Epidemiologic tools to study the influence of environmental factors on fecundity and pregnancy-related outcomes. Epidemiol Rev 2014;36(1):148–64.
- [170] Vrijheid M, Martinez D, Manzanares S, Dadvand P, Schembari A, Rankin J, et al. Ambient air pollution and risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. Environ Health Perspect 2011;119(5):598–606.
- [171] Chen EK, Zmirou-Navier D, Padilla C, Deguen S. Effects of air pollution on the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. Int J Environ Res Public Health 2014;11(8):7642–68.
- [172] Rahmalia A, Giorgis-Allemand L, Lepeule J, Philippat C, Galineau J, Hulin A, et al. Pregnancy exposure to atmospheric pollutants and placental weight: an approach relying on a dispersion model. Environ Int 2012;48:47–55.
- [173] van den Hooven EH, Pierik FH, de KY, Hofman A, van Ratingen SW, Zandveld PY, et al. Air pollution exposure and markers of placental growth and function: the generation R study. Environ Health Perspect 2012;120(12):1753–9.
- [174] Yorifuji T, Naruse H, Kashima S, Murakoshi T, Tsuda T, Doi H, et al. Residential proximity to major roads and placenta/birth weight ratio. Sci Total Environ 2012;414:98–102.
- [175] Baiz N, Slama R, Bene MC, Charles MA, Kolopp-Sarda MN, Magnan A, et al. Maternal exposure to air pollution before and during pregnancy related to changes in newborn's cord blood lymphocyte subpopulations. The EDEN study cohort. BMC Pregnancy Childbirth 2011;11:87.
- [176] Hertz-Picciotto I, Herr CE, Yap PS, Dostal M, Shumway RH, Ashwood P, et al. Air pollution and lymphocyte phenotype proportions in cord blood. Environ Health Perspect 2005;113(10):1391–8.
- [177] Guxens M, Garcia-Esteban R, Giorgis-Allemand L, Forns J, Badaloni C, Ballester F, et al. Air pollution during pregnancy and childhood cognitive and psychomotor development: six European birth cohorts. Epidemiology 2014;25(5):636–47.
- [178] Jedrychowski W, Perera FP, Maugeri U, Mrozek-Budzyn D, Mroz E, Flak E, et al. Early wheezing phenotypes and severity of respiratory illness in very early childhood: study on intrauterine exposure to fine particle matter. Environ Int 2009;35(6):877–84.
- [179] Jedrychowski WA, Perera FP, Spengler JD, Mroz E, Stigter L, Flak E, et al. Intrauterine exposure to fine particulate matter as a risk factor for increased susceptibility to acute broncho-pulmonary infections in early childhood. Int J Hyg Environ Health 2013;216(4):395–401.

- [180] Thiering E, Cyrys J, Kratzsch J, Meisinger C, Hoffmann B, Berdel D, et al. Long-term exposure to traffic-related air pollution and insulin resistance in children: results from the GINIplus and LISAplus birth cohorts. Diabetologia 2013;56(8):1696–704.
- [181] Adar SD, Sheppard L, Vedal S, Polak JF, Sampson PD, ez Roux AV, et al. Fine particulate air pollution and the progression of carotid intima-medial thickness: a prospective cohort study from the multi-ethnic study of atherosclerosis and air pollution. PLoS Med 2013;10(4):e1001430.
- [182] Backes CH, Nelin T, Gorr MW, Wold LE. Early life exposure to air pollution: how bad is it? Toxicol Lett 2013;216(1):47–53.
- [183] Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete SA, Duranthon V. Rabbit as a reproductive model for human health. Reproduction 2012;144(1):1–10.
- [184] Carter AM. Animal models of human placentation a review. Placenta 2007;28(Suppl. A):S41–7.
- [185] Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part Fibre Toxicol 2005;2:8.
- [186] Landsiedel R, Ma-Hock L, Hofmann T, Wiemann M, Strauss V, Treumann S, et al. Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials. Part Fibre Toxicol 2014;11:16.
- [187] Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, Larsen A, Gao X, Vogel U, et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. Part Fibre Toxicol 2011;8:18.
- [188] OECD Guideline for testing of chemicals 416. Two-generation reproduction toxicity study. OECD. 2001.
- [189] OECD Guideline for testing of chemicals 443. Extended one generation study. OECD. 2012.
- [190] OECD Guideline for testing of chemicals. 426. Developmental Neurotoxicity Study. 2007.
- [191] Makris SL, Raffaele K, Allen S, Bowers WJ, Hass U, Alleva E, et al. A retrospective performance assessment of the developmental neurotoxicity study in support of OECD test guideline 426. Environ Health Perspect 2009;117(1): 17–25.
- [192] ISO. Nanotechnologies compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials. Geneva: Switzerland; 2014. ISO. Report No.: ISO/TR 16197.
- [193] Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, et al. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. J Clin Endocrinol Metab 2001;86(10):5017–24.

Gène	Séquences de primers	Numéro d'accession
ACTR	F 5'-CGAGACCACCTTCAACTCGATC-3'	NM 001101682
ACID	R 5'-CTTCTGCATGCGGTCGG-3'	NWI_001101005
EIF4A2	F 5'-TGGCAAGTGGATTATTCGGC-3'	ENSOCUG0000004534
[R 5'-CAGAGACCACAGCCCCACAG-3'	
RPL18	F 5'-CAACTCCACGTTCAACCAGG-3'	DO403030
2.0	R 5'-GGTCTTGTTCTCCCGCCC-3'	- <10,000
SI C2A1	F 5'-ACCACGCTGTGGTCCCTCT-3'	NM 001105687
JEC2/11	R 5'-GCAGGTTCATCATCAGCATTGA-3'	1111_001103007
SLC38A1	F 5'-GCGTGCACACCAAGATACGT-3'	XM 017343592
	R 5'-ACCGATCCTTAAGCTCGCTG-3'	
SLC38A2	F 5'-ATTGTCCGACTGGCTGTGCT-3'	XM 002712695
-	R 5'-CIGIGACGCCACCAACIGAA-3'	_ · · · · ·
CD36		XM 008258299
-		
CAT		XM_002709045
CuZnSOD	$R \leq -CCCACGTGCCTCTCTTCATC-2'$	NM_001082627.1
MnSOD	R 5'-CCTTGCAGCGGATCCTGATT-3'	ENSOCUG0000022337
	F 5'-GCAACCAGTTTGGGCATCAG -3'	
Gpx1	R 5'-TTCACCTCGCACTTCTGGAA-3'	NM_001085444
	F 5'-CCTCTGGGCCGTGGTGCCTT-3'	
KDR	R 5'-GGGCTCGGTGTTCGCTGTGC-3'	NM_001195670
DMD-	F 5'-GGAAACGCCTCAAATCCAGC-3'	
BMP2	R 5'-ACAATCCAGTCGTTCCACCC-3'	NM_0001082650
CDEo	F 5'-CTACAACACAGTTCGACTCTTCAC-3'	NM 001171750
GDF9	R 5'-GTAACGCGATCCAGGTTAAACAG-3'	NM_00171350
SICODAS	F 5'-GCTGTTCGCCTACTTCATCAGA-3'	XM 008254002
JECZZACJ	R 5'-TGGGAGATGAGCCATCGGG-3'	XIM_000234993
TNNC1	F 5'-CCTGTGAACTGACAGCATGGA-3'	XM 002713240
	R 5'-GGCCGCCTTGAACTCATTTTT-3'	
ANGPTL4	F 5'-CTGTCGACCCTGCTCAGAAT-3'	XM 002722024
•	R 5'-GGAICIGGAACAGCCCACIC-3'	_ / '
THBS1		XM 002717799
		_
ABC-A1		XM_002708133
ABC-G1	R 5'-TGCAACTTGGCGTTCTCCAC-3'	ENSOCUT00000027993
HMG-CoA	F 5'-GACTCCCCACACAGAGCTGC-3'	
réductase	R 5'-ATTCTTCATTAGGCCGAGGCT-3'	XM_002723033
	F 5'-GTGCAACTCCGCCAGGGA-3'	
LDL-R	R 5'-GCCGATTCTGAGGTCGAAGC-3'	XM_002723277
	F 5'-AGGATTTCAGCTACAACCGGG-3'	
LXKα	R 5'-GCGAACTCGGCATCATTGAG-3'	AB536719
DDAD	F 5'-TGAACGACCAGGTGACTCTGC-3'	
ггакү	R 5'-TCCCTCGTCATGAAGCCTTG-3'	NWI_001082148
51 (28 4 4	F 5'-GGATGCAGACGGTGTCCAAC-3'	
3103044	R 5'-CTGTAGGCGTGCAGCAGTTC-3'	LN30C010000020469

Annexe 2 | Tableau recapitulative des primers dessinés et utilisés en RT-qPCR

Symbole	Nom	Nom commun
C14:0	Acide tétradécanoique	Acide myristique
C14:1	Acide cis-9-tétradécénoique	Acide myristoléique
C15:0	Acide pentadécanoique	Acide pentadécanoique
C15:1	Acide cis-10-pentadécénoique	Acide penta décénoique
C16:0	Acide héxadécanoique	Acide palmitique
C16:1n-7	Acide cis-9-hexadécénoique	Acide palmitoléique
C18:0	Acide octadécanoique	Acide stéarique
C18:1n-9	Acide cis-9-octadécénoique	Acide oléique
C18:1n-7	Acide cis-11-octadécénoique	Acide vaccenique
C18:2n-6	Acide trans,cis-10,12-octadécadiénoique	Acide linoléique (LA)
C18:3n-6	Acide cis, cis, cis-6,9,12-octa déca triénoique	Acide γ-linolénique (GLA)
C18:3n-3	Acide cis, cis, cis-9, 12, 15-octa décatriénoique	Acide α-linolénique (ALA)
C20:0	Acide eicosanoique	Acide arachidique
C20:1n-9	Acide cis-9-icosénoique	Acide gadoléique
C20:2n-6	Acide cis-11,14-eicosadiénoique	Acide eicosa diénoique
C20:3n-6	Acide cis-8,11,14-eicosatriénoique	Acide Dihomo-γ-linolénique (DGLA)
C20:4n-6	Acide cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-icosatétraénoique	Acide arachidonique (AA)
C20:5n-3	Acide cis, cis, cis, cis, cis-5, 8, 11, 14, 17-icosa penta énoique	Acide timnodonique (EPA)
C22:0	Acide docosanoique	Acide béhénique
C22:1n-9	Acide cis-13-docosénoique	Acide érucique
C22:4n-6	Acide cis, cis, cis, cis-7, 10, 13, 16-docosaté tra énoique	Acide a drénique
C22:5n-6	Acide cis, cis, cis, cis, cis-4,7,10,13,16-docosapenta énoique	Acide osbond
C22:5n-3	Acide cis, cis, cis, cis, cis-4, 8, 12, 15, 19-do cosa penta énoique	Acide cuplanodonique (DPA)
C22:6n-3	Acide cis,cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16,19-docosahéxaénoique	Acide cervonique (DHA)
C24:0	Acide tétra cos a noique	Acide lignocérique
C24:1n-9	Acide cis-15-tétra cosénoique	Acide nervonique

Annexe 3 Acides gras analysés en chromatographie en phase gazeuse avec une colonne Econo-Cap

Annexe 4 | Script du modèle linéaire mixte utilisé dans R.

```
data <- read.csv("W:/STATISTIQUES/Statistiques Thèse/données.csv",sep=";",dec = ",")</pre>
colnames(data)
contrasts(data$Trmt) <- contr.treatment(2,2)</pre>
library(nlme)
liste <- c("Poids","Longueurtete","PA","Efficaciteplacentaire")</pre>
if(!all(liste%in%colnames(data))){
 print("toutes les variables demandées ne sont pas dans la base de données")
liste <- liste[which(liste%in%colnames(data))]</pre>
}
Res <- matrix(NA,0,10)
colnames(Res) <- c("variableExpliquée","N","N_P","N_T","variable","value","CI","p-value","AIC","BIC")
for(i in 1:length(liste)){
    dataT <- cbind(data,name = data[,liste[i]])</pre>
    dataT <- dataT[which(!is.na(dataT$name)),]</pre>
    mod <- summary(lme(name~Trmt+Nbre+Position+Sexe,random=~1|Mere,data=dataT))</pre>
    modT <- mod$tTable[,c("Value","Std.Error","p-value")]</pre>
      for(k in 1:nrow(modT))
      Res <- rbind(Res,c(liste[i],nrow(dataT), sum(dataT$Trmt=="P"),sum(dataT$Trmt=="T"),
        rep(NA,4),round(c(mod$AIC,mod$BIC),1)))
    Res[nrow(Res)+1-nrow(modT):1,c(5,6,8)] <- cbind(rownames(modT),round(modT[,c(1,3)],3))</pre>
    Res[nrow(Res)+1-nrow(modT):1,7] <- paste("[",round(modT[,1]-1.98*modT[,2],3),";",
round(modT[,1]+1.98*modT[,2],3),"]",sep="")
}
Res
```

```
write.table(Res,"Res.csv",sep=";")
```



Annexe 5 | Analyses en composantes principales (PCA) du profil en acides gras du plasma des lapines Fo gestantes à 28 jours post-conception.

L'analyse en composantes principales (ACP), développée en France dans les années 1960 par JP. Benzécri, est une méthode de statistique exploratoire permettant de décrire un grand tableau de données de type individus/variables. Lorsque les individus sont décrits par un nombre important de variables, aucune représentation graphique simple ne permet de visualiser le nuage de points formé par les données. L'ACP propose une représentation dans un espace de dimension réduite, permettant ainsi de mettre en évidence d'éventuelles structures au sein des données. Pour cela, nous recherchons les sousespaces dans lesquels la projection du nuage déforme le moins possible le nuage initial, correspondant aux données résumées dans le Tableau C.2. Le premier axe principal est celui qui maximise la variance lorsque les données sont projetées sur une ligne et le second lui est orthogonal, et maximise à nouveau la variance restante. Les variables, ici les acides gras du profil plasmatique, sont représentés sur une carte des facteurs Variables (ou «cercle de corrélation» de l'ACP, A), où l'angle formé par deux variables représentées sous forme de vecteurs, reflète leur réelle corrélation par paire. Ce cercle des corrélations permet d'identifier les variables qui contribuent «positivement» ou «négativement» aux axes de l'ACP. Le plan principal, défini par les dimensions 1 et 2, représente ici 53,7% de l'inertie des données, résumées dans le Tableau C.2. La principale contribution des acides gras à la dimension 1 se traduit par une corrélation positive (seules les corrélations supérieures à 0,80 sont rapportées ici) avec les AGS (0,93, p = 8,85e-06), C16:0 (0.86, p = 2,97e-04), C14:0 (0,85, p = 3,82e-04), et C16:1n-9 (0,85, p = 3,90e-04), et une corrélation négative avec le C18:3n-3 (-0.89, p = 1,04e-06) et le C18:2n-6 (-0,88, p = 1,04e-06) 1,94e-04). La principale contribution des acides gras à la dimension 2 se traduit par une corrélation positive avec le C22:5n-3 (0,88, p = 0,0002), C22:5n-6 (0,83, p = 0,0006), C18:3n-6 (0,82, p = 0,0010), et le C18:0 (0,81, p = 0,00136) et une très faible corrélation négative avec le C16:1n-7 (-0,61 p = 0,0362). Ces variables sont correctement représentées dans ce plan factoriel puisque leurs corrélations avec les axes sont relativement importantes (les projections sont proches du cercle de corrélation). L'interprétation que l'on peut faire des deux premiers axes factoriels est la suivante : le premier axe factoriel semble opposer les acides gras saturés aux acides gras dits essentiels précurseurs des deux séries n-6 et n-3, LA et ALA, respectivement ; le second axe factoriel semble être caractérisé principalement par les acides gras polyinsaturés à 18 et 22C. Ce plan factoriel étant interprété, nous pouvons y projeter les individus (B). La carte des individus (B) de cette ACP montre que, comme illustré par les ellipses de confiance dessinées autour des individus, aucune signature spécifique en acides gras ne caractérise chaque groupe de mères en fonction de leur exposition in utero ou non, exposées (noir) ou de contrôles (rouge). En effet ceci se confirme en examinant les valeurs des cosinus carrés des angles entre les individus et les axes factoriels, ici les cos² sont très inférieurs à 1 ainsi que la valeur du v.test inférieure à 2 qui montre que le traitement in utero des femelles F1 ne corrèle pas significativement ni avec la dimension 1, ni avec les suivantes. L'utilisation de la description des Modalités dans FactoMineR (v.test correspondant à un Chi2) montre effectivement que nos groupes de femelles ne sont pas distinguables sur la base d'une signature plasmatique spécifique en acides gras, et que les seules différences opposant les deux groupes de lapines femelles Fo est une corrélation positive des lapines exposées avec le C20:1n-7 (v.test = 2,65, p = 0,0079) et le C22:4n-6 (v.test = 2,08, p = 0,0037), confirmant les données statistiques du Tableau C.2.



Annexe 6 | Analyses en composantes principales (PCA) du profil en acides gras (PL) des placentas F1 de lapin à 28 jours post-conception.

L'ACP propose une représentation dans un espace de dimension réduite, permettant de mettre en évidence d'éventuelles structures au sein des données. Pour cela, nous recherchons les sous-espaces dans lesquels la projection du nuage déforme le moins possible le nuage initial, correspondant aux données résumées dans le Tableau C.3. Le cercle des corrélations (A) permet d'identifier les variables, ici les acides gras du profil membranaire placentaire (phospholipides ou PL), qui contribuent « positivement » ou « négativement » aux axes de l'ACP. Le plan principal, défini par les dimensions 1 et 2, représente ici 37,4% de l'inertie des données, résumées dans le Tableau C.3. La principale contribution des acides gras à la dimension 1 se traduit par une corrélation positive (seules les corrélations supérieures à 0,70 sont rapportées ici) avec les C22:4n-6 (0,87, p = 7,98e-18), AGPI (0,86, p = 5,40e-17), C22:5n-6 (0,85, p = 6,23e-16), AGPI n-6 (0,84, p = 1,62e-15), C20:4n-6 (0,83, p = 6,67e-15), AGPI n-3 (0,78, p = 4,23e-12), et C22:5n-3 (0,77, p = 4,65e-12), et une faible corrélation négative avec les AGMI (-0,70, p = 3,73e-09). Le traitement, ici l'exposition, corrèle faiblement avec la dimension 1 (0,23, p=0.0015). La principale contribution des acides gras à la dimension 2 se traduit par une faible corrélation positive avec les AGS à plus de 20, avec C20:0 (0,79, p = 1,40e-12), C24:0 (0,70, p = 3,63e-09), et C22:0 (0,60, p = 1,62e-06), et une corrélation négative avec les C16:1 (-0,72 p = 9,65e-10). La principale contribution des acides gras à la dimension 3 se traduit par une faible corrélation positive avec le c14 :1n-9 (0,74, p = 1,09e-10) et négative avec le C16:0 (-0,74, p = 2,48e-10). Ces variables sont moyennement représentées dans ce plan factoriel puisque leurs corrélations avec les axes sont peu importantes (les projections ne sont pas proches du cercle de corrélation), en effet les variables se distribuent dans les 3 premières dimensions de l'ACP, cum ulant 50,3% de la variance. L'interprétation que l'on peut faire des deux premiers axes factoriels est la suivante : le premier axe factoriel semble opposer les acides gras à longue et très longue chaine aux acides gras monoinsaturés à 16C; le second axe factoriel oppose les acides gras saturés à longue chaine aux acides gras monoinsaturés (à 16C). Ce plan factoriel étant interprété, nous pouvons y projeter les individus (B). La carte des individus (B) de cette ACP montre que, comme illustré par les ellipses de confiance dessinées autour des individus, une signature en acides gras caractériserait spécifiquement chaque groupe de phospholipides placentaires en fonction de l'exposition in utero ou non, exposées (noir) ou de contrôles (rouge) ; cette différence entre les deux groupes est renforcée par l'augmentation de la concentration en acides gras des PL dans le groupe exposé. En effet ces résultats en demi teinte se confirment en examinant les valeurs des cosinus carrés (cos²) des angles entre les individus et les axes factoriels qui restent éloigné de 1 (cos² dim 1= 0,461, dim2=0,169 et dim3=0.293) alors que la valeur du v.test est supérieure à 2 dans les dimensions 1 à 3 (v.test dim 1= E : -2,80 et C : 3,01, dim 2= E : -2,01 et C : -2.24 et dim 3= E : 2,95 et C : -3,17). Ces résultats montrent de faible corrélations des PL placent aires exposés in utero avec la dimension 1 (R^2 = 0,225, p-value= 0,0015) et la dimension 3 (R^2 = 0,250, p-value= 0,0006). L'utilisation de la Description des Modalités dans FactoMineR (v.test correspondant à un Chi2) montre effectivement que les membranes placentaires sont légèrement distinguables sur la seule base d'une signature spécifique en acides gras (effet mère faiblement significatif avec p-value = 0.0453), et que les seules différences opposant les deux types de membranes placentaires sont une corrélation positive des placentas exposés avec le C22:0 (v.test = 3,61, p = 0,0003), C24:1n-9 (v.test = 3,50, p = 0,0005) et le C18:1n-9 (v.test = 2,84, p = 0,0045), et négative avec le C16:0 (v.test = -3,19, p = 0,0014) confirmant les données statistiques du Tableau C.3.



Annexe 7 | Analyses en composantes principales (PCA) du profil en acides gras (LN) des placentas F1 de lapin à 28 jours post-conception.

L'ACP propose une représentation dans un espace de dimension réduite, permettant de mettre en évidence d'éventuelles structures au sein des données. Pour cela, nous recherchons les sous-espaces dans les quels la projection du nuage déforme le moins possible le nuage initial, correspondant aux données résumées dans le Tableau C.4. Le cercle des corrélations (A) permet d'identifier les variables, ici les acides gras du profil membranaire placentaire (phospholipides ou PL), qui contribuent « positivement » ou « négativement » aux axes de l'ACP. Le plan principal, défini par les dimensions 1 et 2, représente ici 39,16% de l'inertie des données, résumées dans le Tableau C.4. La principale contribution des acides gras à la dimension 1 se traduit par une corrélation positive (seules les corrélations supérieures à 0,80 sont rapportées ici) avec les C22:4n-6 (0,91, p = 5,28e-09), AGPI n-6 (0,90, p = 1,19e-08), AGPI (0,88, p = 4,59e-08), C20:4n-6 (0,88, p = 5,56e-08), et C14:0 (0,83, p = 2,04e-06), et une corrélation négative avec les AGMI (-0,85, p = 7,12e-07). La principale contribution des acides gras à la dimension 2 se traduit par une faible corrélation positive avec les AGMI de 16 à 20C, avec C16:1n-7 (0,63, p = 1,61e-03), et une corrélation négative avec les C16:1 (-0,72 p = 9,65e-10). La principale contribution des acides gras à la dimension 3 se traduit par une faible corrélation positive avec le C14:1n-9 (0,74, p = 1,09e-10) et négative avec les AGS (-0,91, p = 5,71e-09), dont le C16:0 (-0,87, p = 1,23e-07) et le C18:0 (-0,68, p = 4,49e-04). Ces variables sont assez bien représentées dans ce plan factoriel puisque leurs corrélations avec les axes sont assez importantes (les projections sont assez proches du cercle de corrélation). L'interprétation que l'on peut faire des deux premiers axes factoriels est la suivante : le premier axe factoriel semble opposer les acides gras polyinsaturés aux acides gras monoinsaturés; le second axe factoriel oppose les acides gras monoinsaturés aux acides gras saturés. Ce plan factoriel étant interprété, nous pouvons y projeter les individus (B). La carte des individus (B) de cette ACP montre que, comme illustré par les ellipses de confiance dessinées autour des individus, une signature en acides gras caractérise spécifiquement chaque groupe de stockages lipidiques placentaires en fonction de l'exposition in utero ou non, exposées (noir) ou de contrôles (rouge). En effet ces résultats se confirment en examinant la valeur des cosinus carrés (cos²) des angles entre les individus et les axes factoriels qui est proche de 1 dans la dimension 1 (cos² dim 1= 0,895) et la valeur du v.test qui est supérieure à 2 dans la dimension 1 (v.test dim 1= E : -3,57 et C : 3,57). Ces résultats montrent de bonnes corrélations des LN placentaires exposés in utero avec la dimension 1 (R^2 = 0,605, p-value= 2,00e-05). L'utilisation de la Description des Modalités dans FactoMineR (v.test correspondant à un Chi2) montre effectivement que les lipides stockés dans les placentas sont légèrement distinguables sur la base d'une signature spécifique en acides gras (effet mère significatif avec p-value = 0.0016), et que les différences opposant les deux types de stockages intracellulaires placentaires sont une corrélation négative des placentas exposés le C20:3n-6 (v.test = -3,23, p = 0,0012), C22:4n-6 (v.test = -3,12, p = 0,0018), C20:4n-3 (v.test = -3,08, p = 0,0020), C14:0 (v.test = -2,46, p = 0,0137), et C22:5n-6 (v.test = -2,02, p = 0,0435) confirmant les données statistiques du Tableau C.4.


Annexe 8 | Analyses en composantes principales (PCA) du profil en acides gras du plasma des fœtus F1 de lapin à 28 jours post-conception.

L'ACP propose une représentation dans un espace de dimension réduite, permettant de mettre en évidence d'éventuelles structures au sein des données. Pour cela, nous recherchons les sous-espaces dans les quels la projection du nuage déforme le moins possible le nuage initial, correspondant aux données résumées dans le Tableau C.5. Le cercle des corrélations (A) permet d'identifier les variables, ici les acides gras du profil plasmatique, qui contribuent « positivement » ou « négativement » aux axes de l'ACP. Le plan principal, défini par les dimensions 1 et 2, représente ici 67,8% de l'inertie des données, résumées dans le Tableau C.5. La principale contribution des acides gras à la dimension 1 se traduit par une corrélation positive (seules les corrélations supérieures à 0,80 sont rapportées ici) avec les AGPI n-3 (0,93, p = 4,08e-0.9), C18:0 (0.92, p = 1,28e-08), C14:1n-9 (0,91, p = 2,89e-08), C22:6n-3 (0,90, p = 4,33e-08), C20:1n-7 (0,90, p = 5,57e-08), C18:1n-7 (0,90, p = 5,70e-08), C20:1 (0,88, p = 4,11e-07), et C22:0 (0,84, p = 4,40e-06), et une corrélation négative avec le C16:1 (-0.87, p = 8,52e-07). La principale contribution des acides gras à la dimension 2 se traduit par une corrélation positive avec les AGS (0,94, p = 6,16e-10), C16:0 (0,84, p = 2,76e-06), et une corrélation négative avec le C18:2n-6 (-0,98 p = 1,73e-13), AGPI n-6 (-0,97 p = 1,69e-12), AGPI (-0,95 p = 2,38e-10), C18:3n-3 (-0,87 p = 6,70e-17), C18:1n-9 (-0,84 p = 3,31e-06), et C20:4n-6 (-0,83 p = 6,50e-06). Ces variables sont correctement représentées dans ce plan factoriel puisque leurs corrélations avec les axes sont relativement importantes (les projections sont proches du cercle de corrélation). L'interprétation que l'on peut faire des deux premiers axes factoriels est la suivante : le premier axe factoriel semble opposer les acides gras à longue et très longue chaine aux acides gras monoinsaturés à 16C; le second axe factoriel caractérisant mieux les individus, oppose les acides gras saturés aux acides gras mono- et polyinsaturés (surtout n-6). Ce plan factoriel étant interprété, nous pouvons y projeter les individus (B). La carte des individus (B) de cette ACP montre que, comme illustré par les ellipses de confiance dessinées autour des individus, aucune signature en acides gras ne caractérise spécifiquement chaque groupe de fœtus en fonction de leur exposition in utero ou non, exposées (noir) ou de contrôles (rouge). En effet ceci se confirme en examinant les valeurs des cosinus carrés des angles entre les individus et les axes factoriels, ici les cos² sont très inférieurs à 1 ainsi que la valeur du v.test inférieure à 2 qui montre que le traitement in utero des fœtus F1 ne corrèle pas significativement ni avec la dimension 1, ni avec les suivantes, même si la dimension 2 est celle qui caractériserait le mieux les individus (v.test dim2=1,230<2 ; cos² dim2=0.574).

Annexe 9 : Exposition aux gaz d'échappement diesel durant la gestation : quelles conséquences sur le développement foeto-placentaire ? Apport des modèles animaux.

Valentino S., Tarrade A., Chavatte-Palmer P.

Publié en 2016 dans Bull. Acad. Vét. France, 169.

EXPOSITION AUX GAZ D'ÉCHAPPEMENT DIESEL DURANT LA GESTATION: QUELLES CONSÉQUENCES SUR LE DÉVELOPPEMENT FŒTO-PLACENTAIRE ? APPORT DES MODÈLES ANIMAUX

CONSEQUENCES OF EXPOSURE TO DIESEL EXHAUST DURING GESTATION ON FETO-PLACENTAL DEVELOPMENT. INSIGHT FROM ANIMAL MODELS

> Par Sarah VALENTINO, Anne TARRADE⁽¹⁾, Pascale CHAVATTE-PALMER⁽¹⁾ (Communication présentée le 20 Octobre 2016) Manuscrit accepté le 18 Octobre 2016)

•**R**ÉSUMÉ •

La pollution atmosphérique est un problème majeur pour la santé humaine, causant 3,7 millions de décès prématurés en 2012 dans le monde. Les personnes âgées, les enfants ou les asthmatiques sont les cibles des messages de prévention lors de pics de pollution alors que les femmes enceintes sont le plus souvent négligées. Pourtant, les études épidémiologiques et les travaux sur les modèles animaux indiquent que la pollution atmosphérique et ses composants peuvent perturber la fonction placentaire, réduire la croissance fœtale et induire un stress oxydant et une inflammation. A long terme, ces effets peuvent participer à l'augmentation des risques de maladies métaboliques chez l'adulte. Il est donc important d'inclure les femmes enceintes dans les messages de prévention lors de pics de pollution atmosphérique et de continuer la recherche sur les effets à long terme grâce au recours aux modèles animaux.

Mots-clés : pollution atmosphérique, diesel, modèles animaux, grossesse, gestation, développement.

ABSTRACT

Air pollution is a major threat for human health, causing 3.7 million premature deaths in 2012 worldwide. Elderly people, children and people suffering from asthma in outbursts of air pollution peaks are the most concerned whereas pregnant women are most often neglected. Epidemiological surveys and studies using animal models indicate that the components of air pollution can disturb placental function, reduce foetal growth and induce oxidative stress and inflammation in the mother, placenta and foetus. On the long term, these effects can contribute to the current worldwide increase in adult metabolic diseases in the context of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). It is therefore important to include pregnant women as recipients of preventative messages for air pollution and to carry on research on long term effects using relevant animal models and procedures.

Keywords: air pollution, diesel, animal models, pregnancy, gestation, development.

⁽¹⁾ INRA (équipe PEPPS – UMR Biologie du Développement et Reproduction), Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France Email : valentino.sarah@orange.fr ; anne.tarrade@inra.fr ; pascale.chavatte-palmer@inra.fr

INTRODUCTION

La pollution atmosphérique est un problème majeur pour la santé humaine, causant 3,7 millions de décès prématurés en 2012 dans le monde (United Nations Environment Programme 2014). La plupart des villes des pays développés et en développement, où les taux de pollution sont mesurés, ne respectent pas les directives préconisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (United Nations Environment Programme, 2014). Les personnes âgées, les enfants ou les asthmatiques sont les cibles des messages de prévention lors de pics de pollution alors que les femmes enceintes sont le plus souvent négligées.

POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE ET GAZ D'ÉCHAPPEMENT DIÉSEL

Caractérisation de la pollution atmosphérique

Les polluants atmosphériques sont soit émis (polluants primaires) ou formés dans l'atmosphère (polluants secondaires). Les polluants primaires incluent le dioxyde de sulfure, les oxydes d'azote, le monoxyde de carbone, les composés volatiles organiques et les particules primaires. Ils sont libérés dans l'atmosphère par des sources telles que les cheminées d'usines, les systèmes d'échappement des véhicules, les feux de foyers ouverts. Dans les espaces confinés, les personnes peuvent être exposées à des solvants (vernis, peintures) et des nanoparticules manufacturées (industrie). Les polluants secondaires proviennent de la réaction chimique entre certains polluants primaires et l'atmosphère (ozone, oxydes d'azote et particules secondaires). Les polluants atmosphériques sont généralement classés en fonction de la taille de la fraction particulaire : PM10 (Particulate Matter 10, de diamètre inférieur à 10 µm), PM2, 5 (inférieur à 2,5 µm) et les particules ultrafines (inférieur à 100 nm). La catégorie PM10 est la plus fréquemment utilisée comme indicateur de la concentration particulaire atmosphérique. Les concentrations annuelles moyennes dans les grandes villes au niveau mondial sont rassemblées dans le tableau 1 (Organisation Mondiale de la Santé, 2005; AirParif, 2016). De par leur faible diamètre, les

Dénian	Concentration moyenne annuelle (µg/m3)		
Region	PM10	Dioxyde d'azote	
Afrique	40 - 150	35 – 65	
Asie	35 – 220	20 – 75 🦯	
Australie/Nouvelle-Zélande	28 – 127	11 – 28 35 – 70	
Etats-Unis/Canada	20 - 60		
Europe	20 – 70	18 – 57	
Amérique latine	30 – 129	30 - 82	
Valeurs seuils (OMS)	20	40	
Objectifs actuels de qualité en Europe	<25	<40	

Tableau 1 : Concentrations moyennes annuelles en PM10 et dioxyde d'azote en 2005 dans une sélection de villes représentatives, valeurs seuils au-delà-desquelles la pollution atmosphérique est considérée comme nuisible à la santé (Organisation Mondiale de la Santé. 2005) et seuils d'alerte préconisés en Europe (AirParif, 2016).

PM 2,5 possèdent la capacité de pénétrer profondément dans les poumons et d'atteindre la circulation sanguine (Wichmann, 2007). Les particules ultrafines (ou nanoparticules) constituent la fraction dominante des particules (Morawska *et al.* 2004). Elles ne sont pas utilisées comme indicateurs des risques pour la santé ni soumises à réglementation, alors qu'elles possèdent un rapport surface/volume important qui permet l'adsorption d'une grande quantité de composés organiques et métalliques à leur surface, dont elles peuvent devenir les vecteurs. Parmi les composés volatiles utilisés comme indicateurs de pollution, le dioxyde d'azote (N0₂), qui provient en majeure partie du trafic routier, est un des composants majeurs du *smog* (brume brunâtre épaisse limitant la visibilité dans l'atmosphère).

Trafic routier et pollution

La première source majeure de la pollution atmosphérique est le transport routier. Des réglementations nationales ou internationales pour les taux de polluants émis par les véhicules ont été mises en place dans divers pays, visant en particulier le nombre de grammes de polluant émis (composés organiques volatiles et/ou particules ou une combinaison de ces derniers) par kilomètre au cours de cycles de conduite. Les cycles modaux, utilisés en Europe, sont une compilation d'accélération linéaire et de périodes à vitesse constante et ne sont pas représentatifs du comportement d'un vrai conducteur. Les cycles transitoires, utilisés aux États-Unis, comportent de nombreuses variations de vitesse et ressemblent davantage aux conditions de la conduite sur route.

En 2015, suite à une alerte de l'ONG américaine International Council on Clean Transportation (<u>www.theicct.org</u>), la société allemande Volkswagen a été accusée par l'agence américaine de protection environnementale (<u>www.epa.gov</u>) d'avoir inséré dans les véhicules de ses clients un dispositif permettant de reconnaître les conditions de test lors des cycles de conduite et de réduire artificiellement l'émission de polluants atmosphériques lors du passage du test. Un rapport de l'association Transport et

Environnement soutenue par l'Europe (projet Life) et par l'International Council on Clean Transportation indique qu'en Europe des dispositifs de même type sont aussi présents dans 23 véhicules neufs produits par six constructeurs (Volkswagen, Audi, BMW, Citroën, Opel et Mercedes) (Transport & Environment, 2015).

Gaz d'échappement de moteurs diesel

L'avantage majeur du moteur diesel comparé aux moteurs à essence est sa plus grande robustesse et son meilleur rendement énergétique. Cependant, les moteurs diesel émettent plus de particules par kilomètre parcouru que les moteurs à essence. L'utilisation importante des véhicules diesel dans le secteur du transport privé en Europe induit inévitablement une forte exposition continue de la majeure partie de la population (Steiner *et al.* 2016). Les gaz d'échappement de moteur diesel sont un mélange complexe se divisant en trois fractions : une phase solide, une phase condensée et une phase gazeuse (Westerholm & Egeback, 1994 ; Chan et al. 2007). La phase solide PM (Particulate Matter) est majoritairement composée de particules carbonées primaires avec un noyau de carbone élémentaire (EC) ou « carbone suie » de 10 à 30 nm de diamètre (Liati & Eggenschwiler, 2010). Ces particules peuvent s'agglomérer et former des agrégats d'un diamètre de 60 à 100 nm, sachant que les filtres à particules utilisés sur les véhicules actuels filtrent surtout les particules jusqu'à 400nm et ont une efficacité très réduite pour les particules de taille inférieure à 100nm. En plus du carbone suie, cette phase solide contient des métaux et des métaux oxydés provenant des additifs des huiles de lubrification et du carburant ainsi que de l'usure du moteur. Ces additifs contiennent des éléments métalliques comme composants fonctionnels tels le zinc et le magnésium pour les huiles et le cérium, le fer, le manganèse, le platine et le cuivre pour le carburant (Mayer et al. 2010). Le carbone suie possède une faible capacité à se dissoudre dans les tissus biologiques comme la muqueuse pulmonaire, ce qui joue un rôle dans sa toxicité (Steiner et al. 2012 ; Ma et al. 2014), mais les composés toxiques adsorbés à la surface des particules ainsi que leurs propriétés physico-chimiques participent aussi à sa toxicité.

La phase gazeuse, composée à 99% par des gaz inorganiques non toxiques comme l'azote, l'eau et l'oxygène, comporte aussi des gaz toxiques (dioxyde de carbone (CO_2), monoxyde de carbone (CO), le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2).

La fraction organique est caractérisée par de petites molécules comme le méthanol, l'éthylène ou le formaldéhyde mais surtout par des grosses molécules comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les composés aromatiques hétérocycliques (CAH).

POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE ET GROSSESSE : ÉTUDES ÉPIDEMIOLOGIQUES

Dans les études épidémiologiques, plusieurs marqueurs sont utilisés afin d'estimer l'exposition des femmes enceintes à la pollution atmosphérique (mesures effectuées par les associations de surveillance de la qualité de l'air, météorologie, proximité du lieu de vie des grands axes routiers, capteur porté sur les vêtements...). Des modèles mathématiques alliant données réelles (concentrations pour un polluant donné, conditions météorologiques) et des estimations (modèles de dispersion) sont ensuite utilisés pour estimer au plus près l'exposition des personnes. Le sexe de l'enfant, l'âge gestationnel, l'âge de la mère, sa parité, son lieu de résidence (lorsqu'il n'est pas utilisé comme facteur d'estimation), la saison, le tabagisme, les paramètres socio-économiques, etc. sont souvent pris en compte en tant que covariables.

Effets sur la fertilité

Peu de données sont disponibles sur les effets de la pollution atmosphérique sur la fertilité de la femme. Cependant, dans une cohorte de femmes à Teplice en République tchèque, une diminution de la fécondité de 22% est observée pour chaque augmentation de $10\mu g/m^3$ des concentrations en PM2,5 et NO₂, alors qu'aucune association significative n'est mise en évidence pour les autres polluants atmosphériques (Slama *et al.* 2013).

Pollution atmosphérique et grossesse

Les maladies non-infectieuses les plus fréquentes pendant la grossesse sont le retard de croissance intra-utérin (RCIU) associé ou non à une pré-éclampsie (PE) (syndrome lié à un défaut d'invasion lors de l'implantation) (Tsatsaris *et al.* 2010 ; Geyl *et al.* 2014). Le RCIU et la PE sont tous deux dus à une hypoperfusion placentaire et affectent plus de 15% des grossesses (10% pour le RCIU et quatre à sept % pour la PE). Enfin, la prématurité affecte plus de 7% des naissances en France et est en constante augmentation (Valery *et al.* 2015). L'environnement maternel au sens large peut affecter la fonction placentaire et les échanges entre la mère et le fœtus et il est bien établi que le tabagisme est une cause majeure de RCIU et de prématurité (Mund *et al.* 2013 ; Banderali *et al.* 2015). Il est assez logique de suspecter un rôle de la pollution atmosphérique dans ces pathologies.

Pathologie placentaire

Un lien a été observé entre l'augmentation des concentrations en NO et NO₂ et l'apparition de l'un des symptômes de PE (hypertension artérielle) chez la femme enceinte (Olsson *et al.* 2015). De plus, une augmentation de la concentration en oxydes d'azote dans l'air environnant la femme enceinte est associée à une réduction, chez le nouveau-né, de la concentration plasmatique en vitamine D, impliquée dans de nombreux processus cellulaires et métaboliques dont le métabolisme des os et du calcium (Baiz *et al.* 2012).

En France, le risque de naissances prématurées a été comparé entre les zones rurales et les zones urbaines de Bretagne : il est plus important dans ces dernières où la concentration en NO_2 est plus élevée (Bertin *et al.* 2015). De plus, cette relation est amplifiée en présence de maladies maternelles telles que le diabète, l'asthme ou la pré-éclampsie (Lavigne *et al.* 2016).

Retard de croissance intra-utérin

Une série d'études indique des effets clairs, mais parfois faibles, de la pollution atmosphérique sur le risque de retard de croissance fœtale (Slama *et al.* 2007 ; Slama *et al.* 2009 ; Ebisu & Bell 2012 ; Romao *et al.* 2013 ; Cândido da Silva *et al.* 2014 ; Fleisch *et al.* 2015 ; Stieb *et al.* 2016). Aux États-Unis, une diminution du poids de naissance en rapport avec l'augmentation de la concentration en PM2,5 est observée seulement chez les garçons dont les mères sont obèses, ces dernières représentant 34,5% de la cohorte étu-

diée (Lakshmanan et al. 2015). De plus, la concentration en NO₂ et autres oxydes d'azote est associée à une diminution du diamètre bipariétal de l'enfant, mais pas nécessairement à un RCIU (Ritz et al. 2014 ; Bertin et al. 2015). Une corrélation négative entre la concentration en PM10 et le risque de petit poids de naissance est au contraire observée à Sao Paulo au Brésil : l'augmentation de l'exposition à la pollution serait contrebalancée par le profil socio-économique élevé des familles étudiées (Habermann & Gouveia, 2014). En France, les effets d'une augmentation des concentrations en polluants atmosphériques sont comparés dans les villes de Nancy et de Poitiers. À Nancy, où les concentrations atmosphériques sont toujours plus élevées qu'à Poitiers, une augmentation de la pollution atmosphérique est associée à une diminution du poids et de l'efficacité placentaire. À Poitiers, l'association est inverse, avec une augmentation du poids placentaire (Rahmalia et al. 2012). Il existe donc une disparité entre les résultats des études épidémiologiques selon le lieu, la population concernée et le type de marqueur de pollution utilisé pour évaluer la contamination des femmes enceintes.

Malformations fœtales

Une augmentation du risque d'apparition d'affections et d'anomalies cardiaques à la naissance est associée à une augmentation de la concentration de certains polluants atmosphériques et de la densité du trafic routier (Gianicolo *et al.* 2014; Padula *et al.* 2014).

POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE ET GESTATION : MODÉLES ANIMAUX

Pour des raisons éthiques indiscutables, le recours aux modèles animaux est nécessaire afin de vérifier les résultats des études épidémiologiques et d'analyser les mécanismes

sous-jacents aux effets observés. Il s'agit essentiellement de modèles rongeurs et il est important de noter que la comparaison entre toutes les études présentées par la suite est complexe compte tenu des techniques d'exposition utilisées, ainsi que des temps et des fenêtres d'exposition ou encore du type et de la concentration des particules utilisées.

Caractéristiques des modèles animaux et modes d'exposition

Modèles animaux

De par leur faible coût, leur maniabilité et leur cycle de reproduction rapide, les rongeurs et secondairement les lagomorphes sont principalement utilisés pour les études sur les effets de la pollution atmosphérique pendant la gestation. Pour les études de toxicologie durant la gestation et de tératologie, le lapin reste le modèle de choix (Fischer *et al.* 2012). Du fait de la large dimension des voies aériennes supérieures chez l'être humain, les particules présentes dans l'air contaminé sont peu filtrées alors que la petite taille des narines chez la souris prévient certainement davantage le passage de particules dans le poumon. Le lapin représente un modèle intermédiaire pour ce paramètre.

La placentation de type hémochorial, caractérisée par un chorion directement en contact avec le sang maternel, est commune à l'espèce humaine, aux rongeurs et aux lagomorphes. Chez la femme, les villosités choriales sont regroupées en amas formant une vingtaine de cotylédons dans la chambre inter-villeuse irriguée par les artères maternelles. Chez les rongeurs et les lapines, le placenta est de type labyrinthique, la zone d'échange fœto-maternelle formant un réseau de villosités chorioniques fusionnées qui entourent les lacunes sanguines maternelles. Chez la femme et la lapine, le placenta est dit hémodichorial : une couche de syncytiotrophoblaste repose sur une couche de cytotrophoblaste basal. Chez les rongeurs, le placenta est défini comme hémotrichorial : une couche de cellules géantes trophoblastiques est apposée sur deux couches cellulaires de syncytiotrophoblaste basal (figure 1) (Malassiné et al. 2003; Tarrade et al. 2014).

L'ensemble de ces animaux a une gestation courte (de 18-20 jours chez les rongeurs et 31 jours pour les lagomorphes) alors que la gestation humaine est longue de 40 semaines. L'impact de ces différences sur le développement d'adaptations chroniques dans les relations fonctionnelles fœto-placentaires reste difficile à évaluer.

Enfin, la taille du lapin permet un suivi de la gestation par échographie avec les outils classiquement utilisés en médecine humaine, au contraire des rongeurs (Chavatte-Palmer *et al.* 2008 ; Fischer *et al.* 2012).



Figure 1 : Classification histologique des placentas hémochoriaux (hémodichorial, hémotrichorial).

Chez l'humain, le placenta est de type hémodichorial puis la couche de cytotrophoblaste (aussi appelé cytotrophoblaste villeux) devient discontinue pour former un placenta dit hémomonochorial à terme. Le lapin possède un placenta de type hémodichorial (une couche de cytotrophoblaste et une couche de syncytiotrophoblaste). Les rongeurs ont un placenta de type hémotrichorial avec une couche de cellules géante trophoblastiques directement en contact avec le sang maternel.

VF: Vaisseau fœtal; SF : Sang fœtal; MB : Membrane basale; Sy : Syncytiotrophoblaste; Cy : Cytotrophoblaste; CGT: Cellules géantes trophoblastiques; EM : Espace sanguin maternel.

Modes d'exposition

Chez l'homme, l'exposition à la pollution atmosphérique est limitée à la voie respiratoire, bien qu'une petite partie des polluants passe probablement par la voie orale du fait de la position de la trachée. Les modes d'exposition les plus représentatifs sont ceux pour lesquels la voie d'entrée des composés volatils et des particules est la même que chez l'humain (inhalation). Les études par inhalation sont cependant limitées par la difficulté de les mettre en place. D'autres approches (injections, gavages) sont donc souvent utilisées.

Chambres d'inhalation

Pour la modalité d'inhalation, les animaux évoluent dans des chambres où ils sont exposés soit à de l'air extérieur pollué non filtré, soit à des gaz d'échappement dont la concentration est mesurée. Cette méthode, qui a l'avantage d'être continue et de laisser les animaux libres de leurs mouvements, est la plus proche de ce qui se produit lors de la contamination humaine. Cependant, le comportement naturel de léchage des animaux entraine une contamination supplémentaire par voie orale qu'il est difficile de quantifier.

Inhalation nasale

Afin d'éviter les biais liés au comportement de léchage, les animaux sont placés dans des dispositifs (tubes) qui permettent une exposition seulement des voies respiratoires. Ils doivent être habitués à la procédure afin de limiter leur stress. L'exposition est forcément limitée à quelques heures par jour en raison de la contention nécessaire.

Instillation

Les polluants étudiés (hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP, particules ...) sont dilués dans un liquide physiologique. Après une anesthésie légère, les animaux sont maintenus afin de déposer ou de propulser dans la trachée, à l'aide d'une pipette, la quantité souhaitée de particules en suspension. L'inconvénient majeur est que les polluants n'atteignent pas forcément les alvéoles pulmonaires.

Administration n'utilisant pas la voie pulmonaire : gavage ou injections

Les polluants dilués dans un vecteur sont administrés oralement par gavage ou injectés à l'animal, sans passer par la voie pulmonaire. Différentes voies d'injection sont utilisées (intrapéritonéale, intraveineuse, sous-cutanée).

Effets de l'exposition à la pollution atmosphérique sur le déroulement de la gestation dans les modèles animaux

La complexité de l'interprétation des études vient de la grande diversité des modèles utilisés, des polluants étudiés, de leur dosage et des stades de gestation explorés. L'ensemble des données est résumé dans le **tableau 2**. Nous avons classé les résultats par voie d'exposition, l'inhalation étant la plus proche de l'exposition humaine et la seule voie d'administration pour les gaz d'échappement diesel. Pour les autres approches (gavages, injections), des nanoparticules manufacturées sont généralement étudiées. Certains travaux utilisant des points ou boîtes quantiques (*quantum dots*), c'est-à-dire des nanoparticules de quelques nm utilisées surtout pour les injections en imagerie biomédicale, sont incluses afin de compléter cette revue car elles sont les seules disponibles sur les effets de particules d'aussi petit diamètre.

Dans l'ensemble, des réponses inflammatoires importantes sont observées, mais aussi des perturbations endocrines, suggérant que la pollution atmosphérique pourrait aussi avoir un effet de perturbateur endocrinien. Les effets de l'inhalation sont importants et semblent parfois plus marqués que pour les autres voies. Une partie des résultats présentés ici a fait l'objet de revues récentes (Ema *et al.* 2013 ; Hougaard *et al.* 2015).

Exposition par inhalation

L'exposition de rates ou de souris gestantes à des concentrations de gaz d'échappement de moteur diesel (DE) faibles, proches des niveaux actuels d'exposition humaine (tableau 1), pendant la première moitié de la gestation perturbe sa régulation endocrine. L'expression d'enzymes clés impliquées dans les voies de synthèse des stéroïdes est réduite, induisant une diminution des concentrations plasmatiques de progestérone et d'œstradiol et une augmentation des concentrations d'hormone lutéotrope LH, la présence du corps jaune étant obligatoire pour le maintien de la gestation chez les rongeurs. De façon étonnante, les fœtus exposés sont plus lourds et de taille plus réduite que les témoins (Li et al. 2013). Une expérience similaire chez la souris avec des nanoparticules de cadmium induit aussi des perturbations de la stéroïdogenèse ; bien que la taille fœtale soit aussi réduite, le poids des fœtus n>est pas affecté, mais celui des placentas à terme est augmenté (Blum et al. 2012). Chez la souris, une exposition similaire pendant la plus grande partie de la gestation induit des résorptions embryonnaires et fœtales accompagnées de lésions placentaires importantes (hémorragies, congestion, nécrose, compaction des espaces vasculaires, infiltration de cellules immunitaires et stress oxydatif) (Fujimoto et al. 2005; Weldy et al. 2014). Aux concentrations d'exposition les plus élevées, l'expression génique placentaire de plusieurs cytokines proinflammatoires (interleukines IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 α et β) est très largement augmentée (Fujimoto et al. 2005). L'exposition in utero à des concentrations élevées de DE induit aussi une augmentation marquée de l'expression d'interleukines (IL-1β, IL-6, IL-10) et de chimiokines (chemokine ligand 2 et fractalkine) dans le cerveau des fœtus à terme (Bolton et al. 2012).

Récemment, notre équipe a exposé des lapines gestantes, par la méthode d'inhalation nasale, à des gaz d'échappement de moteur diesel dilués et filtrés pour ne laisser passer que les nanoparticules, ce qui correspond à un filtrage par les filtres à particules en vigueur sur les véhicules diesel récents. L'exposition correspond à l'exposition journalière d'une femme lors de pic

DOI: 10.4267/2042/61628

6

Espèce, lignée	Effectifs (mode, période et temps d'exposition)	Polluant (concentrations)	Âge aux observations (Sexe si précisé) Fonction étudiée	Résultats	Ref.
Rats F344	6 femelles gestantes par groupe (chambre d'inhalation, 1 à 9 jpc, 5h/j)	NR-DE (148,86µg/m³, 1.83x10 ⁶ NPs/cm³) F-DE (3.10 µg/m³, 2.66 NPs/cm³)	Mères gestantes et fœtus à 20 jpc Endocrinologie Croissance fœtale	 ✓ ratio du poids du foie et du poids de la rate rapportés poids maternel; perturbations de la stéroidogénèse lutéale : concentration plasmatique en P4 √, LH, oestradiol-17β et corticostérone ^A; expression génique de l'enzyme P450, 3β-HSD et récepteur à LH √dans le corps jaune; poids fœtal ^A, taille fœtale √ 	Li et al. 2013
Souris C57BL/6	3C vs 4P (chambre d'inhalation, 0,5 à 17,5 jpc 6h/j, 5j/ semaine)	DE (300µg/m³)	12 semaines post-natales (mâles) Croissance fœto- placentaire	A nombre de résorptions embryonnaires et fœtales; dans le placenta: hémorragies et congestions, nécrose, compaction des espaces vasculaires labyrinthiques, infiltration de cellules immunitaires et stress oxydatif	Weldy et al. 2014
Souris ICR	32C vs 26, 26 et 31P (chambre d'inhalation, 2 à 13 jpc 12h/jour et 7j/7)	DE (0,3/1/3mg/m³)	Placentas à 14 jpc Croissance fœto- placentaire	↑ nombre de résorptions fœtales et congestion placentaire; ↑ expression cytokines IL2, IL5, IL12α et IL12β, IL6 et GM-CSF (fonction immune du placenta) jusqu'à X10 pour certains	Fujimoto e <i>t al.</i> 2005
Souris C57BL/6	6C vs 6P (chambre d'inhalation, 9 à 17 jpc 4h/j)	DE (2 mg/m³)	18 jpc et 60 jpn (mâles et femelles) Inflammation (cerveau)	A 18jpc (cerveau fœtaux):↑ cytokines proinflammatoires et chémokines (IL1béta, IL6, CCL2/ MCP-1 et CX3CL1/Fractalkine) et inhibiteur de la synthèse de cytokines (IL10)	Bolton et al. 2012
Lapines New- Zealand	12 C et 16P (41 fœtus C et 68 fœtus P) (inhalation nasale, 3 à 27 jpc, 2h/j, 5j/semaine)	DE (1 mg/m³, diamète moyen 69 nm)	Unités foeto-placentaires à 28 jpc Structure et flux placentaires	 	Valentino <i>et al.</i> 2016
Souris C57BL/6	22 femelles gestantes par groupe (chambre d'inhalation, 8 à 18 jpc à 8, 11, 15 et 18 jpc)	Nanotubes de carbone (67µg; dose totale de 268µg sur la gestation)	Mères exposées à terme Inflammation (poumons) et croissance fœtale	Inflammation pulmonaire;	Hougaard et al. 2013
Souris CD1	(chambre d'inhalation, de 4,5 à 16,5 jpc; 100µg/m3 tous les deux jours ou 230 µg/m3/j pendant 2,5 heures)	Nanoparticules d'oxyde de cadmium	Mères et fœtus Endocrinologie de la gestation, terme	Perturbations de la stéroidogénèse lutéale : concentration plasmatique en oestradiol ♥; ♠ expression des récepteurs aux oestrogènes dans l'utérus; poids placentaire ♠, taille fœtale ♥	Blum et al. 2012
Rats Sprague- Dawley	23C vs 24 à 100, 21 à 200 et 23 à 400 (gavage, 5 à 19 jpc; 1 gavage/j)	Nanoparticules d'oxyde de zinc avec corona de L-Sérine (100/200/400mg/kg/j)	Fœtus 20 jpc Comportement et	Effets toxiques chez la mère : ♥ prise alimentaire (doses moyenne et forte); ♥ poids corporel et poids du foie (doses moyenne et forte); ↑ poids des glandes surrénales (dose forte); ♥ poids fœtal; ↑ malformations	Hong et al. 2014b
Rats Sprague- Dawley	23C vs 24 à 100, 21 à 200 et 23 à 400 (gavage, 5 à 19 jpc; 1 gavage/j)	Nanoparticules d'oxyde de zinc avec corona molécules de citrate (100/200/400mg/kg/ jour)	biométrie maternels; croissance fœtale	Effets toxiques chez la mère : ♥ poids corporel (dose forte); ♥ poids du foie (doses moyenne et forte) ; ↑ poids des glandes surrénales (dose forte); Croissance fœtale : Pas d'effet	Hong et al. 2014a
Rats Sprague- Dawley	11 femelles inséminées par groupe (gavage; 6 à 19 jpc; 1 fois/j)	Nanoparticules d'argent (100/300/1000mg/kg/j)	Mères gestantes et fœtus à 20 jpc Foie maternel et croissance fœto- placentaire	 ♦ activité de la catalase et de la glutathion réductase (≥100mg) ; ♦ concentration en glutathion (dose forte); pas d'effet toxiques sur la gestation ou l'unité fœto- placentaire. 	Yu et al. 2014
Rats Wistar Albino	426 fœtus dont 114 contrôles soit 3-5 femelles gestantes/ groupe (injection IP à 6, 13 ou 18 jpc)	Nanoparticules de seleniure de cadmium, de sulfure de zinc (500µL à 0.8µM) et de tellurure de cadmium (5mg/kg)	Unités fœto-placentaires à 21 jpc Croissance fœto- placentaire	Pas d'effets délétères ou tératogènes sur les fœtus. Nécrose des tissus de la cavité péritonéale	Zalgeviciene et al. 2012
Souris ICR	20 femelles gestantes/ groupe (injection IV à 6,5 jpc)	Nanoparticules d'argent de 8 nm de diamètre)(1mg NPs/kg)	Unités foeto-placentaires à 13,5; 15,5 et 17,5 jpc Croissance fœto- placentaire et méthylation	progression des cellules de la lignée germinale femelle chez les fœtus; perturbation de l'expression et de la methylation de certains gènes soumis à empreinte à G15,5	Zhang e <i>t al.</i> 2015
Souris Kunming	4 groupes de 5 femelles gestantes (injection IV, 16 et 17 jpc; 1 injection/j)	Nanoparticules de seleniure de cadmium, sulfure de zinc et chlorure de cadmium (0,5µM et injection de 100µL/animal/j)	Unités foeto-placentaires à 18 jpc Croissance fœto- placentaire	CdSe : Dérégulations placentaires conduisant à des malformations fœtales pour les CdSe, cependant les particules semblent être bloquées par le placenta. CdSe/ ZnS : croissance fœtale $lateries Altération de l'expression deplusieurs gènes impliqués dans l'apoptose, la dysplasie,le transport de métaux et le stress oxydatif$	Zhang et al. 2016
Souris CD-1	14 à 18 femelles gestantes/groupe (injection IP, 9 jpc ou de 9 à 18 jpc; 1 injection/i)	Nanoparticules de fer de différentes charges de surface (10mg NPs/ kg = 2,5mg Fe/kg)	Mères gestantes et unités foeto-placentaires à 17 jpc	mort fœtale, accumulation de particules de fer dans le placenta et dans le foie fœtal. Les 2 eux types de particules traversernt le placenta mais les particules chargées positivement ont des effets plus délétères.	Di Bona et al. 2014

Tableau 2: Effets de la pollution atmosphérique sur la croissance fœto-placentaire: récapitulatif des études disponibles. Recherche effectuée sur Pubmed (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</u>) couvrant la période de janvier 2000 à juin 2016 avec les mots-clés : diesel exhaust, atmospheric pollution, inhalation, pregnancy, gestation, nanoparticle. C : Contrôles ; P : pollués; DE : gaz d'échappement diesel (Diesel Exhaust) ; E : Exposition ; F-DE : gaz d'échappement diesel filtré (Filtered Diesel Exhaust) ; jpc : jours post-conception ; jpn : jours post-nataux ; NR-DE : gaz d'échappement diesel enrichi en nanoparticules (Nanoparticle enRiched Diesel Exhaust)

de pollution dans une grande ville européenne. Les fœtus montrent un léger retard de croissance à mi-gestation et présentent un retard de croissance de la tête et une réduction du périmètre abdominal trois jours avant la naissance (Valentino *et al.* 2016). Les concentrations plasmatiques d'insuline et de facteur de croissance IGF1 (*Insuin-like growth factor 1*) sont réduites dans le sang fœtal, comme chez les fœtus humains RCIU. Le placenta présente des défauts de perfusion constatés par Doppler 3D quantitatif et confirmés par examen histologique. Enfin, le passage transplacentaire des particules de diesel est confirmé par microscopie électronique à transmission (Valentino *et al.* 2016).

Autres techniques d'exposition

L'exposition de rates gestantes, par gavage, à des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) chargées positivement ou négativement (20 nm de diamètre) entraîne des effets toxiques chez la mère avec une réduction de la consommation alimentaire, ainsi qu'une diminution du poids corporel et du poids du foie et pour les doses les plus fortes, une augmentation du poids des glandes surrénales Seule l'exposition à une dose moyenne des nanoparticules chargées positivement provoque une réduction du poids des fœtus et une augmentation de l'incidence de malformations (Hong *et al.* 2014a ;Hong *et al.* 2014b). Dans la même espèce, le gavage par des nanoparticules d'argent induit des signes de stress oxy-

datif au niveau hépatique chez la mère (réduction de l'expression protéique de la catalase, le gluthation-péroxydase), sans perturbation des marqueurs biochimiques sanguins (Yu *et al.* 2014). La gestation (taille des portées et taux de résoptions fœtale) et la biométrie fœto-placentaire ne sont pas affectées en dehors d'une augmentation de la taille relative des cerveaux fœtaux (Yu *et al.* 2014).

Une exposition à des nanotubes de carbone par instillation intratrachéale entraîne une inflammation pulmonaire maternelle et une diminution de la prolificité sans différence du nombre de sites d'implantation, suggérant un effet sur l'implantation précoce (Hougaard *et al.* 2013).

Chez la rate, l'injection de nanoparticules (points quantiques) de séléniure de cadmium ou de sulfure de zinc (5mg/kg) à six, 13 ou 18 jpc (jours postconception), n'entraine pas d'éffets délétères ni tératogènes sur les fœtus. Les nanoparticules peuvent s'accumuler dans le placenta sans atteindre le fœtus (Zalgeviciene *et al.* 2012). Chez la souris, une exposition

à des concentrations trois fois plus élevées du même type de particules induit des dérégulations placentaires conduisant à des RCIU et des malformations fœtales avec une variabilité selon la nature (taille, composition, forme) des particules. Comme les particules semblent être bloquées par le placenta, leurs effets seraient indirects, peut-être par modification des flux sanguins et perturbation des échanges transplacentaires (Zhang et al. 2016). L'expression placentaire de plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose, le transport de métaux et le stress oxydatif est aussi altérée (Zhang et al. 2016). La charge électrique des nanoparticules peut jouer un rôle : l'exposition pendant plusieurs jours de souris gestantes à des nanoparticules de fer chargées positivement induit une mortalité fœtale et l'accumulation de particules de fer dans le placenta et dans le foie fœtal, les particules chargées positivement ayant des effets toxiques plus importants que les autres particules (Di Bona et al. 2014).

Le développement des gonades fœtales peut aussi être affecté : chez la souris, l'exposition à des nanoparticules d'argent perturbe la migration des cellules de la lignée germinale femelle chez les fœtus. L'expression de plusieurs gènes soumis à empreinte à G15,5 (15 jours et demi de gestation) est perturbée avec des anomalies de méthylation de l'ADN (Zhang *et al.* 2015).

Effets placentaires sur plusieurs générations



Figure 2 : Schéma expérimental chez la souris (Veras et al., 2008)

Dans cette étude, le modèle utilisé est une exposition continue par inhalation dans des chambres avec filtré (témoins) ou non («pollué», centre ville de Sao Paulo). Les souris sont exposées sur trois générations (F0, F1, F2), la mise à la reproduction étant systématiquement réalisée à partir de 60 jours après la naissance (jpn). T : Témoin, P : Pollué;

TT, PT, TP et PP : la première lettre correspond à l'exposition en période pré-conceptionnelle et la deuxième lettre en période gestationnelle.



Une étude brésilienne évalue l'effet fœto-placentaire transgénérationnel de l'exposition continue de souris à l'air ambiant du centre-ville de Sao Paulo sur leur descendance (Veras et al. 2009). Les souris sont exposées sur trois générations, la saillie se réalisant à partir de 60 jours post-nataux (cf protocole dans la *figure 2*). Les animaux testés sont des femelles (F2) dont les parents (F1) et grands-parents (F0) (mâles et femelles) ont été exposés et qui ont été elles-mêmes exposées depuis leur naissance à l'air de Sao Paulo filtré ou non. Le nombre de follicules antraux est réduit de 36% dans les ovaires des animaux exposés par rapport aux témoins, ce qui s'accompagne d'un temps de saillie (temps observé entre la mise en cohabitation du mâle et de la femelle et l'apparition du bouchon vaginal) augmenté et d'une fertilité réelle réduite. Durant la gestation, le nombre de résorptions fœtales est augmenté dans tous les groupes de femelles exposées à la pollution, que ce soit en en période pré-conceptionnelle et/ou gestationnelle (groupes PP, TP et PT), les pertes atteignant 70% dans le groupe PP (Veras et al. 2009). Le poids des fœtus de la troisième génération est diminué de façon équivalente (-20%) dans tous les groupes exposés (Veras et al. 2009) mais une diminution du volume et de la surface des espaces sanguins maternels n'est observée que dans le groupe PP, associée à une augmentation de la surface des vaisseaux fœtaux (Veras et al. 2008).

Dans notre propre travail, des lapines gestantes (F0) ont exposées à des gaz d'échappement diesel filtrés durant la gestation ; leurs descendantes (F1), élevées en air pur, sont accouplées à des mâles témoins. Une dyslipidémie (hypocholestérolémie et hypertriglycéridémie) est observée chez les fœtus F2 mâles et femelles, sans retard de croissance associé (Valentino *et al.* 2016). Elle est associée à un excès de stockage hépatique d'acides gras chez la mère et à un filtrage placentaire sélectif des acides gras oméga 3 de la mère vers le fœtus (Delphine Rousseau, données non publiées).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Des études épidémiologiques ont mis en évidence qu'une exposition maternelle à la pollution atmosphérique liée au trafic routier, mesurée par différents marqueurs, peut entrainer des effets délétères sur la croissance fœto-placentaire et sur le déroulement de la grossesse. Le recours aux modèles animaux permet de mettre en évidence que l'inhalation d'air pollué par la pollution atmosphérique (gaz d'échappement de moteur diesel ou des nanoparticules manufacturées) entraine une réduction de la perfusion placentaire ainsi que des phénomènes d'inflammation et du stress oxydant dans le placenta et certains organes fœtaux et perturbe le développement fœtal et placentaire.

Il est bien établi que le déroulement de la vie intra-utérine, en particulier la trajectoire de croissance du fœtus et les adaptations physiologiques mises en place en fonction de l'environnement maternel durant la grossesse, joue un rôle important en déterminant les risques de l'individu à développer à l'âge adulte des maladies non-transmissibles telles que le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, etc. On parle des origines développementales de la santé et des maladies ou DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) (Barker et al. 2002, Hanson & Gluckman 2014). La dégradation de la qualité de l'alimentation dans les pays développé et la contamination de notre environnement par des perturbateurs endocriniens sont les facteurs les plus souvent incriminés pour comprendre l'épidémie actuelle d'obésité et de maladies métaboliques. Cependant, l'exposition chronique à la pollution atmosphérique pourrait aussi jouer un rôle, comme le suggère en particulier une étude chez la souris qui montre que l'exposition fœtale à des gaz d'échappement diesel augmente la réponse post-natale à un régime obésogène, avec des effets qui varient selon le sexe de l'individu (Bolton et al. 2012, Bolton et al. 2013).

L'ensemble de ces observations souligne la nécessité d'inclure les femmes enceintes dans les messages de prévention aux personnes vulnérables lors de pics de pollution atmosphérique. Le recours aux études faisant appel aux modèles animaux reste nécessaire afin de préciser l'ampleur des risques induits par l'exposition à la pollution atmosphérique, en particulier lors d'exposition prolongée durant la vie de l'individu et d'évaluer l'intérêt préventif d'apports nutritionnels équilibrés par rapport à l'alimentation de type occidental qui prévaut dans les pays développés ou de la supplémentation en anti-oxydants (vitamines, acides gras oméga 3...) pendant et même avant la grossesse.

REMERCIEMENTS

Les auteurs ont bénéficié d'un financement de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-CESA-0011-EPAPP, porté par P. Chavatte-Palmer) et du European Research Council (Consolidator grant N°311765–E-DOHaD, porté par Rémy Slama) pour leur projet sur les lapins. Elles remercient le réseau européen COST SALAAM (Sharing Advances on Large Animal Biomedical Models, BM1308) qui leur permet des échanges avec d'autres chercheurs européens utilisant des modèles animaux non-rongeurs.

BIBLIOGRAPHIE

 AirParif. Directives européennes. Disponible sur: <u>http://www.airparif.asso.fr/reglementation/</u> <u>normes-europeennes</u>. (consulté le 25/08/2016).

- Baiz N, Dargent-Molina P, Wark JD, Souberbielle JC, Slama R, Annesi-Maesano I et al. Gestational exposure to urban air pollution related to a decrease in cord blood vitamin D levels. J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97: 4087-95. doi:10.1210/jc.2012-1943.
- Banderali G, Martelli A, Landi M, Moretti F, Betti F, Radaelli G *et al.* Short and long term health effects of parental tobacco smoking during pregnancy and lactation: A descriptive review. Journal of translational medicine 2015; 13: 327. doi:10.1186/s12967-015-0690-y.
- Barker DJP, Eriksson JG, Forsen T,Osmond C. Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. International Journal of Epidemiology 2002; 31: 1235-39. doi:10.1093/ije/31.6.1235.
- Bertin M, Chevrier C, Serrano T, Monfort C, Rouget F, Cordier S *et al.* Association between prenatal exposure to traffic-related air pollution and preterm birth in the Pelagie mother-child cohort, brittany, france. Does the urban-rural context matter? Environ Res. 2015; 142: 17-24. doi:10.1016/j. envres.2015.06.005.
- Blum JL, Xiong JQ, Hoffman C,Zelikoff JT. Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth. Toxicol Sci. 2012; 126: 478-86. doi:10.1093/toxsci/kfs008.
- Bolton JL, Huff NC, Smith SH, Mason SN, Foster WM, Auten RL *et al.* Maternal stress and effects of prenatal air pollution on offspring mental health outcomes in mice. Environ Health Perspectives 2013; 121: 1075-82. doi:10.1289/ehp.1306560.
- Bolton JL, Smith SH, Huff NC, Gilmour MI, Foster WM, Auten RL, *et al.* Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. FASEB J. 2012; 26: 4743-54. doi:10.1096/fj.12-210989.
- Cândido da Silva AM, Moi GP, Mattos IE,Hacon SdS. Low birth weight at term and the presence of fine particulate matter and carbon monoxide in the brazilian amazon: A population-based retrospective cohort study. BMC Pregnancy and Childbirth 2014; 14: 1-8. doi:10.1186/1471-2393-14-309.
- Chan TL, Ning Z, Wang JS, Cheung CS, Leung CW,Hung WT. Gaseous and particle emission factors from the selected on-road petrol/gasoline, diesel, and liquefied petroleum gas vehicles. Energ Fuel 2007; 21: 2710-8.
- Chavatte-Palmer P, Laigre P, Simonoff E, Chesne P, Challah-Jacques M,Renard JP. In utero characterisation of fetal growth by ultra-

sound scanning in the rabbit. Theriogenology 2008; 69: 859-69. doi:10.1016/j.theriogeno-logy.2007.12.013.

- Di Bona KR, Xu Y, Ramirez PA, DeLaine J, Parker C, Bao Y *et al.* Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant cd-1 mice. Reprod Toxicol. 2014; 50: 36-42. doi:10.1016/j.reprotox.2014.09.010.
- Ebisu K & Bell ML. Airborne pm2.5 chemical components and low birth weight in the northeastern and mid-atlantic regions of the united states. Environ Health Perspectives 2012; 120: 1746-1752. doi:10.1289/ ehp.1104763.
- Ema M, Naya M, Horimoto M,Kato H. Developmental toxicity of diesel exhaust: A review of studies in experimental animals. Reprod Toxicol. 2013; 42C: 1-17. doi:10.1016/j.reprotox.2013.06.074.
- Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarete-Santos A,Duranthon V. Rabbit as a reproductive model for human health. Reproduction 2012; 144: 1-10. doi:10.1530/ REP-12-0091.
- Fleisch AF, Rifas-Shiman SL, Koutrakis P, Schwartz JD, Kloog I, Melly S *et al.* Prenatal exposure to traffic pollution: Associations with reduced fetal growth and rapid infant weight gain. Epidemiology 2015; 26: 43-50. doi:10.1097/ede.0000000000203.
- Fujimoto A, Tsukue N, Watanabe M, Sugawara I, Yanagisawa R, Takano H, *et al.* Diesel exhaust affects immunological action in the placentas of mice. Environmental Toxicology 2005; 20: 431-40. doi:10.1002/ tox.20129.
- Geyl C, Clouqueur E, Lambert J, Subtil D, Debarge V,Deruelle P. Liens entre prééclampsie et retard de croissance intra-utérin. Gynecol Obstet Fertil. 2014; 42: 229-33. doi:10.1016/j.gyobfe.2014.01.008.
- Gianicolo EA, Mangia C, Cervino M, Bruni A, Andreassi MG,Latini G. Congenital anomalies among live births in a high environmental risk area--a case-control study in brindisi (southern italy). Environ Res. 2014; 128: 9-14. doi:10.1016/j.envres.2013.11.002.
- Habermann M & Gouveia N. Socioeconomic position and low birth weight among mothers exposed to traffic-related air pollution. PLoS One 2014; 9: e113900. doi:10.1371/journal. pone.0113900.
- Hanson MA & Gluckman PD. Early developmental conditioning of later health and disease: Physiology or pathophysiology? Physiol Rev. 2014; 94: 1027-76. doi:10.1152/physrev.00029.2013.
- Hong JS, Park MK, Kim MS, Lim JH, Park GJ, Maeng EH *et al.* Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in

rats. Int J Nanomedicine 2014a; 9 Suppl 2: 159-71. doi:10.2147/IJN.S57932.

- Hong JS, Park MK, Kim MS, Lim JH, Park GJ, Maeng EH *et al.* Effect of zinc oxide nanoparticles on dams and embryo-fetal development in rats. Int J Nanomedicine 2014b; 9 Suppl 2: 145-57. doi:10.2147/IJN.S57931.
- Hougaard KS, Campagnolo L, Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Valentino S *et al.* A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. Reprod Toxicol. 2015; 56: 118-40. doi:10.1016/j.reprotox.2015.05.015.
- Hougaard KS, Jackson P, Kyjovska ZO, Birkedal RK, De Temmerman PJ, Brunelli A *et al.* Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. Reprod Toxicol. 2013; 41: 86-97. doi:10.1016/j.reprotox.2013.05.006.
- Lakshmanan A, Chiu YH, Coull BA, Just AC, Maxwell SL, Schwartz J *et al.* Associations between prenatal traffic-related air pollution exposure and birth weight: Modification by sex and maternal pre-pregnancy body mass index. Environ Res. 2015; 137: 268-77. doi:10.1016/j.envres.2014.10.035.
- Lavigne E, Yasseen AS, 3rd, Stieb DM, Hystad P, van Donkelaar A, Martin RV *et al.* Ambient air pollution and adverse birth outcomes: Differences by maternal comorbidities. Environ Res. 2016; 148: 457-66. doi:10.1016/j.envres.2016.04.026.
- Li C, Li X, Suzuki AK, Zhang Y, Fujitani Y, Nagaoka K *et al.* Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. J Reprod Dev. 2013; 59: 145-50. doi:DN/ JST.JSTAGE/jrd/2012-145.
- Liati A & Eggenschwiler PD. Characterization of particulate matter deposited in diesel particulate filters: Visual and analytical approach in macro-, micro- and nano-scales. Combust Flame 2010; 157: 1658-70.
- Ma JY, Young SH, Mercer RR, Barger M, Schwegler-Berry D, Ma JK *et al.* Interactive effects of cerium oxide and diesel exhaust nanoparticles on inducing pulmonary fibrosis. Toxicol Appl Pharmacol. 2014; 278: 135-47. doi:10.1016/j.taap.2014.04.019.
- Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. Hum Reprod Update 2003; 9: 531-9. doi:10.1093/humupd/dmg043
- Mayer A, Ulrich A, Czerwinski J,Mooney J. Metal-oxide particles in combustion engine exhaust. SAE Technical paper 2010; 01: 0792. doi:10.4271/2010-01-0792
- Morawska J, Moore MR, Ristovski Z. Health impacts of ultrafine particles. Canberra, Commonwealth of Australia. 2004 Disponible sur https://www.environment.gov.au/system/ files/resources/00dbec61-f911-494b-bbc1-

<u>adc1038aa8c5/files/health-impacts.pdf</u>. (consulté le 2/9/2016).

- Mund M, Louwen F, Klingelhoefer D, Gerber A. Smoking and pregnancy--a review on the first major environmental risk factor of the unborn. International journal of environmental research and public health 2013; 10: 6485-99. doi:10.3390/ijerph10126485.
- Olsson D, Mogren I, Eneroth K, Forsberg B. Traffic pollution at the home address and pregnancy outcomes in stockholm, sweden. BMJ Open 2015; 5: e007034. doi:10.1136/ bmjopen-2014-007034.
- Organisation Mondiale de la Santé. Lignes directrices oms rlatives à la qualité de l'air : Particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre. Mise à jour mondiale 2005. 2005 Disponible sur: <u>http://apps.who.int/iris/ bitstream/10665/69476/1/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_fre.pdf.</u> (consulté le 29.08.2016).
- Padula AM, Mortimer KM, Tager IB, Hammond SK, Lurmann FW, Yang W et al. Traffic-related air pollution and risk of preterm birth in the san joaquin valley of california. Ann Epidemiol. 2014; 24: 888-95. e884. doi:10.1016/j.annepidem.2014.10.004.
- Rahmalia A, Giorgis Allemand L, Lepeule J, Philippat C, Galineau J, Hulin A *et al.* Pregnancy exposure to atmospheric pollutants and placental weight: An approach relying on a dispersion model. Env Int. 2012; 48: 47-55. doi:10.1016/j.envint.2012.06.013.
- Ritz B, Qiu J, Lee PC, Lurmann F, Penfold B, Erin Weiss R et al. Prenatal air pollution exposure and ultrasound measures of fetal growth in los angeles, california. Environ Res. 2014; 130: 7-13. doi:10.1016/j.envres.2014.01.006.
- Romao R, Pereira LA, Saldiva PH, Pinheiro PM, Braga AL, Martins LC. The relationship between low birth weight and exposure to inhalable particulate matter. Cad Saude Publica 2013; 29: 1101-8.
- Slama R, Bottagisi S, Solansky I, Lepeule J, Giorgis-Allemand L,Sram R. Short-term impact of atmospheric pollution on fecundability. Epidemiology 2013; 24: 871-9. doi:10.1097/EDE.0b013e3182a702c5.
- Slama R, Morgenstern V, Cyrys J, Zutavern A, Herbarth O, Wichmann HE et al. Trafficrelated atmospheric pollutants levels during pregnancy and offspring's term birth weight: A study relying on a land-use regression exposure model. Environmental Health

Perspectives 2007; 115: 1283-92. doi:10.1289/ ehp.10047.

- Slama R, Thiebaugeorges O, Goua V, Aussel L, Sacco P, Bohet A *et al.* Maternal personal exposure to airborne benzene and intrauterine growth. Environmental Health Perspectives 2009; 117: 1313-21. doi:10.1289/ehp.0800465.
- Steiner S, Bisig C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Diesel exhaust: Current knowledge of adverse effects and underlying cellular mechanisms. Arch Toxicol. 2016; 90:1541-53. doi:10.1007/s00204-016-1736-5.
- Steiner S, Mueller L, Popovicheva OB, Raemy DO, Czerwinski J, Comte P *et al.* Cerium dioxide nanoparticles can interfere with the associated cellular mechanistic response to diesel exhaust exposure. Toxicology Letters 2012; 214: 218-25. doi:10.1016/j. toxlet.2012.08.026.
- Stieb DM, Chen L, Hystad P, Beckerman BS, Jerrett M, Tjepkema M et al. A national study of the association between traffic-related air pollution and adverse pregnancy outcomes in canada, 1999-2008. Environ Res. 2016; 148: 513-26. doi:10.1016/j.envres.2016.04.025.
- Tarrade A, Chavatte-Palmer P, Guillomot M, Camous S, Evain-Brion D. Le placenta. In: La reproduction animale et humaine. St Dizier M, Chastant-Maillard S, editors. Versailles: Quae; 2014, pp. 367-407.
- Transport & Environment. Don't breather here beware of the invisible killer. Tackling air pollution from vehicles. 2015 Disponible sur : http://www.transportenvironment.org/sites/ te/files/publications/Dont_Breathe_Here report_FINAL.pdf. (consulté le 29.08.2016).
- Tsatsaris V, Fournier T,Winer N. Pathophysiologie de la préeclampsie. Ann Fr Anesth Reanim. 2010; 29: e13-18. doi:10.1016/j.annfar.2010.02.011.
- United Nations Environment Programme. Air pollution: World's worst environmental health risk. UNEP Year Book 2014; 7: 42-7.
- Valentino SA, Tarrade A, Aioun J, Mourier E, Richard C, Dahirel M, *et al.* Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits. Part Fibre Toxicol. 2016; 13: 39. doi:10.1186/s12989-016-0151-7.
- Valery S, Picone O, Coatantiec Y, Frati A, Labrousse C,Ayoubi JM. Prématurité modérée 34–37 sa : Description des causes et

conséquences néonatales immédiates dans une maternité de niveau 2. Gynécologie Obstétrique & Fertilité 2015; 43: 582-7. doi:org/10.1016/j.gyobfe.2015.06.009.

- Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Ribeiro A, Mayhew TM, Saldiva PHN *et al.* Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. Biology of Reproduction 2008; 79: 578-84. doi:10.1095/biolreprod.108.069591.
- Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Guimaraes Silva RM, Scoriza JN, Saldiva PH, Caldini EG *et al.* Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. Environ Res. 2009; 109: 536-43. doi:10.1016/j.envres.2009.03.006.
- Weldy CS, Liu Y, Liggitt HD,Chin MT. In utero exposure to diesel exhaust air pollution promotes adverse intrauterine conditions, resulting in weight gain, altered blood pressure, and increased susceptibility to heart failure in adult mice. PLoS One 2014; 9: e88582. doi:10.1371/journal.pone.0088582.
- Westerholm R & Egeback KE. Exhaust emissions from light- and heavy-duty vehicles: Chemical composition, impact of exhaust after treatment, and fuel parameters. Environ Health Perspectives 1994; 102 Suppl 4: 13-23.
- Wichmann HE. Diesel exhaust particles. Inhal Toxicol. 2007; 19 Suppl 1: 241-4. doi:10.1080/08958370701498075.
- Yu WJ, Son JM, Lee J, Kim SH, Lee IC, Baek HS et al. Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. Nanotoxicology 2014; 8 Suppl 1: 85-91. doi:10.3109/17435390.2013.857734.
- Zalgeviciene V, Kulvietis V, Bulotiene D, Didziapetriene J,Rotomskis R. The effect of nanoparticles in rats during critical periods of pregnancy. Medicina (Kaunas) 2012; 48: 256-64.
- Zhang W, Yang L, Kuang H, Yang P, Aguilar
 ZP, Wang A *et al.* Acute toxicity of quantum dots on late pregnancy mice: Effects of nanoscale size and surface coating. J Hazard Materials 2016; 318: 61-9. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.06.048.
- Zhang XF, Park JH, Choi YJ, Kang MH, Gurunathan S,Kim JH. Silver nanoparticles cause complications in pregnant mice. Int J Nanomedicine 2015; 10: 7057-71. doi:10.2147/IJN.S95694.

Références

- (UNEP) U.N.E.P. (2014) UNEP Year Book 2014 emerging issues update Air pollution: World's worst envrionmental health risk. UNEP Year Book, 42-7.
- Administration S.E.P. (2002) Report on the state of atmospheric environment in China of 2002.
- Agency U.E.P. (2003) Peak air quality statistics for the six principal pollutants by metropolitan statistical area.
- Agency U.E.P. (2006) Air trends.
- Aiken C.E. & Ozanne S.E. (2014) Transgenerational developmental programming. *Hum Reprod Update* **20**, 63-75.
- Ain R., Canham L.N. & Soares M.J. (2005) Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction impacts the placental prolactin family, insulin-like growth factor-II and the Akt signaling pathway. *J Endocrinol* **185**, 253-63.
- AirParif (2016a) Association de surveillance de la qualité de l'air. URL <u>http://www.airparif.asso.fr/</u>.
- AirParif (2016b) Surveillance et information sur la qualité de l'air en Ile-de-France Bilan année 2015.
- Alberti K.G., Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.I., Donato K.A., Fruchart J.C., James W.P., Loria C.M., Smith S.C., Jr., International Diabetes Federation Task Force on E., Prevention, Hational Heart L., Blood I., American Heart A., World Heart F., International Atherosclerosis S. & International Association for the Study of O. (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640-5.
- Ali H., Kalashnikova I., White M.A., Sherman M. & Rytting E. (2013) Preparation, characterization, and transport of dexamethasone-loaded polymeric nanoparticles across a human placental in vitro model. *Int J Pharm* **454**, 149-57.
- Allen E., Piontek K.B., Garrett-Mayer E., Garcia-Gonzalez M., Gorelick K.L. & Germino G.G. (2006) Loss of polycystin-1 or polycystin-2 results in dysregulated apolipoprotein expression in murine tissues via alterations in nuclear hormone receptors. *Hum Mol Genet* **15**, 11-21.
- Alsat E., Malassiné A., Tarrade A., Merviel P. & Evain-Brion D. (1999) Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste. *Médecin/sciences* **15**, 1236-43.
- Amusquivar E. & Herrera E. (2003) Influence of changes in dietary fatty acids during pregnancy on placental and fetal fatty acid profile in the rat. *Biol Neonate* **83**, 136-45.
- Antinolo M., Willis M.D., Zhou S. & Abbatt J.P. (2015) Connecting the oxidation of soot to its redox cycling abilities. *Nat Commun* **6**, 6812.
- Astbury S., Mostyn A., Symonds M.E. & Bell R.C. (2015) Nutrient availability, the microbiome, and intestinal transport during pregnancy. *Appl Physiol Nutr Metab* **40**, 1100-6.
- Attig L., Brisard D., Larcher T., Mickiewicz M., Guilloteau P., Boukthir S., Niamba C.N., Gertler A., Djiane J., Monniaux D. & Abdennebi-Najar L. (2013) Postnatal leptin promotes organ maturation and development in IUGR piglets. *PLoS One* 8, e64616.
- Avagliano L., Garo C. & Marconi A.M. (2012) Placental amino acids transport in intrauterine growth restriction. *J Pregnancy* **2012**, 972562.
- Bacon B.J., Gilbert R.D., Kaufmann P., Smith A.D., Trevino F.T. & Longo L.D. (1984) Placental anatomy and diffusing capacity in guinea pigs following long-term maternal hypoxia. *Placenta* 5, 475-87.
- Bai N. & van Eeden S.F. (2013) Systemic and vascular effects of circulating diesel exhaust particulate matter. *Inhal Toxicol* **25**, 725-34.
- Baiz N., Dargent-Molina P., Wark J.D., Souberbielle J.C., Slama R., Annesi-Maesano I. & Group E.M.-C.C.S. (2012) Gestational exposure to urban air pollution related to a decrease in cord blood vitamin d levels. J Clin Endocrinol Metab 97, 4087-95.

- Barker D.J. & Osmond C. (1986) Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* **1**, 1077-81.
- Barker D.J., Osmond C., Golding J., Kuh D. & Wadsworth M.E. (1989) Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* **298**, 564-7.
- Bastin J., Drakesmith H., Rees M., Sargent I. & Townsend A. (2006) Localisation of proteins of iron metabolism in the human placenta and liver. *Br J Haematol* **134**, 532-43.
- Bavdekar A., Yajnik C.S., Fall C.H., Bapat S., Pandit A.N., Deshpande V., Bhave S., Kellingray S.D. & Joglekar C. (1999) Insulin resistance syndrome in 8-year-old Indian children: small at birth, big at 8 years, or both? *Diabetes* 48, 2422-9.
- Beaujean N., Martin C., Debey P. & Renard J.P. (2005) [Reprogramming and epigenesis]. *Med Sci* (*Paris*) **21**, 412-21.
- Benassayag C., Mignot T.M., Haourigui M., Civel C., Hassid J., Carbonne B., Nunez E.A. & Ferre F. (1997) High polyunsaturated fatty acid, thromboxane A2, and alpha-fetoprotein concentrations at the human feto-maternal interface. J Lipid Res 38, 276-86.
- Bernard J.F., Baeza A., Bonneau S., Debert C., De Pas A., Favez O., Garnoussi P., Ghersi V., Joly F., Kauffmann A., Laj P., Le Treut H., Mahé F. & Pernot P. (2014) Le carbone suie: enjeu présent et futur. In: *Air Parif Actu*.
- Bertin M., Chevrier C., Serrano T., Monfort C., Cordier S. & Viel J.F. (2015a) Sex-specific differences in fetal growth in newborns exposed prenatally to traffic-related air pollution in the PELAGIE mother-child cohort (Brittany, France). *Environ Res* 142, 680-7.
- Bertin M., Chevrier C., Serrano T., Monfort C., Rouget F., Cordier S. & Viel J.F. (2015b) Association between prenatal exposure to traffic-related air pollution and preterm birth in the PELAGIE mother-child cohort, Brittany, France. Does the urban-rural context matter? *Environmental Research* **142**, 17-24.
- Bibee K.P., Illsley N.P. & Moley K.H. (2011) Asymmetric syncytial expression of GLUT9 splice variants in human term placenta and alterations in diabetic pregnancies. *Reprod Sci* **18**, 20-7.
- Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 16, 6-21.
- Blum J.L., Edwards J.R., Prozialeck W.C., Xiong J.Q. & Zelikoff J.T. (2015) Effects of Maternal Exposure to Cadmium Oxide Nanoparticles During Pregnancy on Maternal and Offspring Kidney Injury Markers Using a Murine Model. J Toxicol Environ Health A 78, 711-24.
- Blum J.L., Xiong J.Q., Hoffman C. & Zelikoff J.T. (2012) Cadmium associated with inhaled cadmium oxide nanoparticles impacts fetal and neonatal development and growth. *Toxicol Sci* 126, 478-86.
- Bolton J.L., Auten R.L. & Bilbo S.D. (2014) Prenatal air pollution exposure induces sexually dimorphic fetal programming of metabolic and neuroinflammatory outcomes in adult offspring. *Brain Behav Immun* **37**, 30-44.
- Bolton J.L., Smith S.H., Huff N.C., Gilmour M.I., Foster W.M., Auten R.L. & Bilbo S.D. (2012) Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. *FASEB J* **26**, 4743-54.
- Bonduelle M.L., Dodd R., Liebaers I., Van Steirteghem A., Williamson R. & Akhurst R. (1988) Chorionic gonadotrophin-beta mRNA, a trophoblast marker, is expressed in human 8-cell embryos derived from tripronucleate zygotes. *Hum Reprod* **3**, 909-14.
- Bourotte C., Forti M.C., Taniguchi S., Bicego M.C. & Lotufo P.A. (2005) A wintertime study of PAHs in fine and coarse aerosols in Sao Paulo city, Brazil. *Atmospheric Environment* **39**, 3799-811.
- Boutros R. & Byrne J.A. (2005) D53 (TPD52L1) is a cell cycle-regulated protein maximally expressed at the G2-M transition in breast cancer cells. *Exp Cell Res* **310**, 152-65.
- Bowman C.J., Streck R.D. & Chapin R.E. (2010) Maternal-placental insulin-like growth factor (IGF) signaling and its importance to normal embryo-fetal development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **89**, 339-49.
- Brun E., Barreau F., Veronesi G., Fayard B., Sorieul S., Chaneac C., Carapito C., Rabilloud T., Mabondzo
 A., Herlin-Boime N. & Carriere M. (2014) Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part Fibre Toxicol* 11, 13.

- Burdge G.C. & Wootton S.A. (2003) Conversion of alpha-linolenic acid to palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids in men and women. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **69**, 283-90.
- Burton G.J., Charnock-Jones D.S. & Jauniaux E. (2009) Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction* **138**, 895-902.
- Burtscher H. (2005) Physical characterization of particulate emissions from diesel engines: a review. *Journal of Aerosol Science* **36**, 896-932.
- Butte N.F. (2000) Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* **71**, 1256S-61S.
- Bygren L.O., Kaati G. & Edvinsson S. (2001) Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period. *Acta Biotheor* **49**, 53-9.
- Cai J.Y. & Li M.J. (2016) Interleukin 23 regulates the functions of human decidual immune cells during early pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* **469**, 340-4.
- Campagnolo L., Massimiani M., Palmieri G., Bernardini R., Sacchetti C., Bergamaschi A., Vecchione L., Magrini A., Bottini M. & Pietroiusti A. (2013) Biodistribution and toxicity of pegylated single wall carbon nanotubes in pregnant mice. *Part Fibre Toxicol* **10**, 21.
- Campbell F.M., Bush P.G., Veerkamp J.H. & Dutta-Roy A.K. (1998a) Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta. *Placenta* **19**, 409-15.
- Campbell F.M. & Duttaroy A.K. (1995) Plasma-Membrane Fatty-Acid-Binding Protein (Fabp(Pm)) Is Exclusively Located in the Maternal Facing Membranes of the Human Placenta. *Febs Letters* **375**, 227-30.
- Campbell F.M., Gordon M.J. & Dutta-Roy A.K. (1998b) Placental membrane fatty acid-binding protein preferentially binds arachidonic and docosahexaenoic acids. *Life Sci* **63**, 235-40.
- Campbell F.M., Taffesse S., Gordon M.J. & Dutta-Roy A.K. (1995) Plasma membrane fatty-acidbinding protein in human placenta: identification and characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 1011-7.
- Campen M., Robertson S., Lund A., Lucero J. & McDonald J. (2014) Engine exhaust particulate and gas phase contributions to vascular toxicity. *Inhal Toxicol* **26**, 353-60.
- Campfield L.A., Smith F.J. & Burn P. (1998) Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. *Science* **280**, 1383-7.
- Carneiro M., Rubin C.J., Di Palma F., Albert F.W., Alfoldi J., Barrio A.M., Pielberg G., Rafati N., Sayyab S., Turner-Maier J., Younis S., Afonso S., Aken B., Alves J.M., Barrell D., Bolet G., Boucher S., Burbano H.A., Campos R., Chang J.L., Duranthon V., Fontanesi L., Garreau H., Heiman D., Johnson J., Mage R.G., Peng Z., Queney G., Rogel-Gaillard C., Ruffier M., Searle S., Villafuerte R., Xiong A., Young S., Forsberg-Nilsson K., Good J.M., Lander E.S., Ferrand N., Lindblad-Toh K. & Andersson L. (2014) Rabbit genome analysis reveals a polygenic basis for phenotypic change during domestication. *Science* 345, 1074-9.
- Carreira S.C., Walker L., Paul K. & Saunders M. (2015) The toxicity, transport and uptake of nanoparticles in the in vitro BeWo b30 placental cell barrier model used within NanoTEST. *Nanotoxicology* **9**, 66-78.
- Carter A.M. & Enders A.C. (2016) Placentation in mammals: Definitive placenta, yolk sac, and paraplacenta. *Theriogenology* **86**, 278-87.
- Carter A.M., Nygard K., Mazzuca D.M. & Han V.K. (2006) The expression of insulin-like growth factor and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in mouse placenta. *Placenta* **27**, 278-90.
- Cartwright L., Poulsen M.S., Nielsen H.M., Pojana G., Knudsen L.E., Saunders M. & Rytting E. (2012) In vitro placental model optimization for nanoparticle transport studies. *Int J Nanomedicine* **7**, 497-510.
- CCFA (2015) La croissance du parc automobile français en 2015 à + 0,5 %, l'âge moyen d'une voiture particulière atteint 8,7 ans.

- Celio M.R., Hornung J.P., Burri P., Adé-Damilano M., Kasas S. & Müller O. (2008) Embryologie humaine. URL <u>www.embryology.ch</u>.
- Cerf M.E. & Herrera E. (2016) High Fat Diet Administration during Specific Periods of Pregnancy Alters Maternal Fatty Acid Profiles in the Near-Term Rat. *Nutrients* **8**.
- Cetin I., Alvino G. & Cardellicchio M. (2009) Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition. *J Physiol* **587**, 3441-51.
- Challier J.C. (1989) La barrière placentaire: structure, résistance, asymétrie. *Reprod Nutr Dev* **29**, 703-16.
- Chan T.L., Ning Z., Wang J.S., Cheung C.S., Leung C.W. & Hung W.T. (2007) Gaseous and particle emission factors from the selected on-road petrol/gasoline, diesel, and liquefied petroleum gas vehicles. *Energy & Fuels* **21**, 2710-8.
- Chang C.L. & Deckelbaum R.J. (2013) Omega-3 fatty acids: mechanisms underlying 'protective effects' in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **24**, 345-50.
- Charnock-Jones D.S., Kaufmann P. & Mayhew T.M. (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* **25**, 103-13.
- Chavatte-Palmer P. & Guillomot M. (2007) Comparative implantation and placentation. *Gynecologic* and Obstetric Investigation **64**, 166-74.
- Chavatte-Palmer P., Laigre P., Simonoff E., Chesne P., Challah-Jacques M. & Renard J.P. (2008) In utero characterisation of fetal growth by ultrasound scanning in the rabbit. *Theriogenology* **69**, 859-69.
- Chen Y.Y., Rosario F.J., Shehab M.A., Powell T.L., Gupta M.B. & Jansson T. (2015) Increased ubiquitination and reduced plasma membrane trafficking of placental amino acid transporter SNAT-2 in human IUGR. *Clin Sci (Lond)* **129**, 1131-41.
- Chithrani B.D., Ghazani A.A. & Chan W.C. (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* **6**, 662-8.
- Chomczynski P. & Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Cleal J.K. & Lewis R.M. (2008) The mechanisms and regulation of placental amino acid transport to the human foetus. *J Neuroendocrinol* **20**, 419-26.
- Coan P.M., Angiolini E., Sandovici I., Burton G.J., Constancia M. & Fowden A.L. (2008) Adaptations in placental nutrient transfer capacity to meet fetal growth demands depend on placental size in mice. *J Physiol* **586**, 4567-76.
- Coan P.M., Vaughan O.R., McCarthy J., Mactier C., Burton G.J., Constancia M. & Fowden A.L. (2011) Dietary composition programmes placental phenotype in mice. *J Physiol* **589**, 3659-70.
- Coan P.M., Vaughan O.R., Sekita Y., Finn S.L., Burton G.J., Constancia M. & Fowden A.L. (2010) Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. J Physiol 588, 527-38.
- Connelly T.M., Berg A.S., Harris L.R., 3rd, Hegarty J.P., Ruggiero F.M., Deiling S.M., Brinton D.L. & Koltun W.A. (2014) T-cell activation Rho GTPase-activating protein expression varies with inflammation location and severity in Crohn's disease. *J Surg Res* **190**, 457-64.
- Constancia M., Angiolini E., Sandovici I., Smith P., Smith R., Kelsey G., Dean W., Ferguson-Smith A., Sibley C.P., Reik W. & Fowden A. (2005) Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 19219-24.
- Corcoran J.J., Nicholson C., Sweeney M., Charnock J.C., Robson S.C., Westwood M. & Taggart M.J. (2014) Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17beta-estradiol and estrogen-receptor-specific agonists. *Mol Hum Reprod* **20**, 433-41.
- Cornock R., Gambling L., Langley-Evans S.C., McArdle H.J. & McMullen S. (2013) The effect of feeding a low iron diet prior to and during gestation on fetal and maternal iron homeostasis in two strains of rat. *Reprod Biol Endocrinol* **11**, 32.
- Costa M.A. (2016) The endocrine function of human placenta: an overview. *Reprod Biomed Online* **32**, 14-43.

- Coupe B., Grit I., Darmaun D. & Parnet P. (2009) The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**, R813-24.
- Cross J.C. (2005) IFPA 2004 Award In Placentology Lecture How to make a placenta: Mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice A review. *Placenta* **26**, S3-S9.
- Cross J.C. (2016) Adaptability and potential for treatment of placental functions to improve embryonic development and postnatal health. *Reproduction Fertility and Development* **28**, 75-82.
- Crume T.L., Scherzinger A., Stamm E., McDuffie R., Bischoff K.J., Hamman R.F. & Dabelea D. (2014) The long-term impact of intrauterine growth restriction in a diverse U.S. cohort of children: the EPOCH study. *Obesity (Silver Spring)* **22**, 608-15.
- Cui Y.H., Chen X.Y., Zhou Z., Lei Y., Ma M.N., Cao R.J., Sun T.J., Xu J.L., Huo M.Y., Cao R.J., Wen C.H. & Che Y. (2014) Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressivelike behaviors in adult rats. *Chemosphere* **96**, 99-104.
- d'Hauterive S.P., Berndt S., Tsampalas M., Charlet-Ranaud C., Dubois M., Bourgain C., Hazout A., Foidart J.M. & Geenen V. (2007) Dialogue between blastocyst hCG and endometrial LH/hCG receptor: Which role in implantation? *Gynecologic and Obstetric Investigation* **64**, 156-60.
- da Silva A.M.C., Moi G.P., Mattos I.E. & Hacon S.D. (2014) Low birth weight at term and the presence of fine particulate matter and carbon monoxide in the Brazilian Amazon: a population-based retrospective cohort study. *Bmc Pregnancy and Childbirth* **14**.
- Daniel-Carlier N., Harscoet E., Thepot D., Auguste A., Pailhoux E. & Jolivet G. (2013) Gonad differentiation in the rabbit: evidence of species-specific features. *PLoS One* **8**, e60451.
- Daxinger L. & Whitelaw E. (2012) Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat Rev Genet* **13**, 153-62.
- De Falco S. (2012) The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med* **44**, 1-9.
- de Tayrac M., Le S., Aubry M., Mosser J. & Husson F. (2009) Simultaneous analysis of distinct Omics data sets with integration of biological knowledge: Multiple Factor Analysis approach. *BMC Genomics* **10**, 32.
- Demir R., Kaufmann P., Castellucci M., Erbengi T. & Kotowski A. (1989) Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* **136**, 190-203.
- Department of the Environment and Heritage C. (2004) State of the air : national ambient air quality status and trends report 1991-2001.
- Desai M., Gayle D., Babu J. & Ross M.G. (2005) Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R91-6.
- Desforges M. & Sibley C.P. (2010) Placental nutrient supply and fetal growth. *Int J Dev Biol* **54**, 377-90.
- Detmar J., Rennie M.Y., Whiteley K.J., Qu D.W., Taniuchi Y., Shang X.Y., Casper R.F., Adamson S.L., Sled J.G. & Jurisicova A. (2008) Fetal growth restriction triggered by polycyclic aromatic hydrocarbons is associated with altered placental vasculature and AhR-dependent changes in cell death. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **295**, E519-E30.
- Di Bona K.R., Xu Y.L., Ramirez P.A., DeLaine J., Parker C., Bao Y.P. & Rasco J.F. (2014) Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice. *Reproductive Toxicology* **50**, 36-42.
- Di W.L., Lachelin G.C., McGarrigle H.H., Thomas N.S. & Becker D.L. (2001) Oestriol and oestradiol increase cell to cell communication and connexin43 protein expression in human myometrium. *Mol Hum Reprod* **7**, 671-9.
- Diouf I., Charles M.A., Thiebaugeorges O., Forhan A., Kaminski M., Heude B. & Group E.M.-C.C.S. (2011) Maternal weight change before pregnancy in relation to birthweight and risks of adverse pregnancy outcomes. *Eur J Epidemiol* 26, 789-96.

- Duttaroy A.K. (2000) Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am J Clin Nutr* **71**, 315S-22S.
- Duttaroy A.K. (2009) Transport of fatty acids across the human placenta: a review. *Prog Lipid Res* **48**, 52-61.
- Dzik W.H. (2011) The air we breathe: three vital respiratory gases and the red blood cell: oxygen, nitric oxide, and carbon dioxide. *Transfusion* **51**, 676-85.
- Eerens H., Petroula D., Colafa J., Kalognomou L., Larssen S., van Pul A., Giannouli M., Mellios G., Jonson J.E., Swart R., van Bree L., Hettelingh J.-P., de Leeuw F., Cabala R., Klimont Z., Schoepp W., Moussiopoulos N., Samaras Z., Eleftheriadou S., Barret K., Tarrason L., Dentener F., van Dingenen R., Krol M. & Admas M. (2005) Eurpoean environmental outlook 2005: background document air quality 1990-2030. European Environment Agency.
- El-Sayed Y.S., Shimizu R., Onoda A., Takeda K. & Umezawa M. (2015) Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. *Toxicology* **327**, 53-61.
- Elphick M.C., Hudson D.G. & Hull D. (1975) Transfer of fatty acids across the rabbit placenta. *J Physiol* **252**, 29-42.
- Elphick M.C. & Hull D. (1977) The transfer of free fatty acids across the rabbit placenta. *J Physiol* **264**, 751-66.
- Ema M., Naya M., Horimoto M. & Kato H. (2013) Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. *Reprod Toxicol* **42**, 1-17.
- Energenics (2016) Energenics annonce le succès des essais d'additifs de carburant d'Enercat. URL <u>http://www.prnewswire.fr/news-releases/energenics-annonce-le-succes-des-essais-</u> <u>dadditifs-de-carburant-denercat-155382745.html</u>.
- Environment T. (2015) Don't breathe here beware the invisible killer.
- Eriksson J.G., Forsen T., Tuomilehto J., Osmond C. & Barker D.J.P. (2001) Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *British Medical Journal* **322**, 949-53.
- Eriksson J.G., Forsen T., Tuomilehto J., Winter P.D., Osmond C. & Barker D.J.P. (1999) Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *British Medical Journal* **318**, 427-31.
- Eriksson J.G. & Forsen T.J. (2002) Childhood growth and coronary heart disease in later life. *Annals of Medicine* **34**, 157-61.
- Eto N., Miyagishi M., Inagi R., Fujita T. & Nangaku M. (2009) Mitogen-activated protein 3 kinase 6 mediates angiogenic and tumorigenic effects via vascular endothelial growth factor expression. *Am J Pathol* **174**, 1553-63.
- Européenne C. (2010) Sixième rapport sur les statistiques concernant le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales et à d'autres fins scientifiques dans les États membres de l'Union européenne
- européenne C. (2015) La Commission se félicite de l'accord des États membres sur des contrôles rigoureux de la pollution atmosphérique générée par les émissions des véhicules. URL <u>http://europa.eu/rapid/press-release_IP-15-5945_fr.htm</u>.
- F.A.O. (2006) Les impacts de l'élevage sur l'environnement. URL <u>http://www.fao.org/ag/fr/magazine/0612sp1.htm</u>.
- Favaron P.O., Mess A.M., de Oliveira M.F., Gabory A., Miglino M.A., Chavatte-Palmer P. & Tarrade A. (2013) Morphometric analysis of the placenta in the New World mouse Necromys lasiurus (Rodentia, Cricetidae): a comparison of placental development in cricetids and murids. *Reproductive Biology and Endocrinology* 11.
- Federation I.D. (2006) The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.
- Ferner K. & Mess A. (2011) Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* **178**, 39-50.
- Fischer B., Chavatte-Palmer P., Viebahn C., Santos A.N. & Duranthon V. (2012) Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* **144**, 1-10.

- Flegal K.M., Carroll M.D., Ogden C.L. & Johnson C.L. (2002) Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. JAMA **288**, 1723-7.
- Fleisch A.F., Rifas-Shiman S.L., Koutrakis P., Schwartz J.D., Kloog I., Melly S., Coull B.A., Zanobetti A., Gillman M.W., Gold D.R. & Oken E. (2015) Prenatal exposure to traffic pollution: associations with reduced fetal growth and rapid infant weight gain. *Epidemiology* 26, 43-50.
- Folch J., Lees M. & Sloane Stanley G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Forbes K. & Westwood M. (2008) The IGF axis and placental function. a mini review. *Horm Res* 69, 129-37.
- Fowden A.L. (2003) The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* 24, 803-12.
- Fowden A.L. & Forhead A.J. (2009) Hormones as epigenetic signals in developmental programming. *Experimental Physiology* **94**, 607-25.
- Fowden A.L. & Forhead A.J. (2015) Glucocorticoids as regulatory signals during intrauterine development. *Experimental Physiology* **100**, 1477-87.
- Frias A.E., Morgan T.K., Evans A.E., Rasanen J., Oh K.Y., Thornburg K.L. & 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**, 2456-64.
- Fujimoto A., Tsukue N., Watanabe M., Sugawara I., Yanagisawa R., Takano H., Yoshida S. & Takeda K. (2005) Diesel exhaust affects immunological action in the placentas of mice. *Environmental Toxicology* **20**, 431-40.
- Furukawa S., Kuroda Y. & Sugiyama A. (2014) A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol* **27**, 11-8.
- Gambling L., Lang C. & McArdle H.J. (2011) Fetal regulation of iron transport during pregnancy. *Am J Clin Nutr* **94**, 1903S-7S.
- Garcia-Valdes L., Campoy C., Hayes H., Florido J., Rusanova I., Miranda M.T. & McArdle H.J. (2015) The impact of maternal obesity on iron status, placental transferrin receptor expression and hepcidin expression in human pregnancy. *Int J Obes (Lond)* **39**, 571-8.
- Geller M.D., Ntziachristos L., Mamakos A., Samaras Z., Schmitz D.A., Froines J.R. & Sioutas C. (2006) Physicochemical and redox characteristics of particulate matter (PM) emitted from gasoline and diesel passenger cars. *Atmospheric Environment* **40**, 6988-7004.
- Georgiades P., Ferguson-Smith A.C. & Burton G.J. (2002) Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* **23**, 3-19.
- Geyl C., Clouqueur E., Lambert J., Subtil D., Debarger V. & Deruelle P. (2014) Liens entre prééclampsie et retard de croissance intr-utérin. *Gynecol Obstet Fertil* **42**, 229-33.
- Ghaderi S., Tabatabaei S.R., Varzi H.N. & Rashno M. (2015) Induced adverse effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on neurobehavioral development of offspring of mice. *J Toxicol Sci* **40**, 263-75.
- Ghosh J.K., Heck J.E., Cockburn M., Su J., Jerrett M. & Ritz B. (2013) Prenatal exposure to trafficrelated air pollution and risk of early childhood cancers. *Am J Epidemiol* **178**, 1233-9.
- Giakoumis E.G., Rakopoulos C.D., Dimaratos A.M. & Rakopoulos D.C. (2013) Exhaust emissions with ethanol or n-butanol diesel fuel blends during transient operation: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **17**, 170-90.
- Gianicolo E.A., Mangia C., Cervino M., Bruni A., Andreassi M.G. & Latini G. (2014) Congenital anomalies among live births in a high environmental risk area--a case-control study in Brindisi (southern Italy). *Environ Res* **128**, 9-14.
- Gluckman P.D. & Hanson M.A. (2004) Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* **305**, 1733-6.
- Gluckman P.D., Hanson M.A., Cooper C. & Thornburg K.L. (2008) Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* **359**, 61-73.
- Godfrey K.M., Lillycrop K.A., Burdge G.C., Gluckman P.D. & Hanson M.A. (2007) Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatr Res* **61**, 5R-10R.

- Gonzalez P.N., Gasperowicz M., Barbeito-Andres J., Klenin N., Cross J.C. & Hallgrimsson B. (2016) Chronic Protein Restriction in Mice Impacts Placental Function and Maternal Body Weight before Fetal Growth. *PLoS One* **11**, e0152227.
- Gore A.C., Chappell V.A., Fenton S.E., Flaws J.A., Nadal A., Prins G.S., Toppari J. & Zoeller R.T. (2015) Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* **36**, 593-602.
- Goyal R. & Longo L.D. (2013) Maternal protein deprivation: sexually dimorphic programming of hypertension in the mouse. *Hypertens Res* **36**, 29-35.
- Grafmueller S., Manser P., Diener L., Diener P.A., Maeder-Althaus X., Maurizi L., Jochum W., Krug H.F., Buerki-Thurnherr T., von Mandach U. & Wick P. (2015) Bidirectional Transfer Study of Polystyrene Nanoparticles across the Placental Barrier in an ex Vivo Human Placental Perfusion Model. *Environmental Health Perspectives* **123**, 1280-6.
- Groer M.W., Gregory K.E., Louis-Jacques A., Thibeau S. & Walker W.A. (2015) The Very Low Birth Weight Infant Microbiome and Childhood Health. *Birth Defects Research Part C-Embryo Today-Reviews* **105**, 252-64.
- Groothuis P.G., Dassen H.H., Romano A. & Punyadeera C. (2007) Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update* **13**, 405-17.
- Grova N., Salquebre G., Schroeder H. & Appenzeller B.M.R. (2011) Determination of PAHs and OH-PAHs in Rat Brain by Gas Chromatography Tandem (Triple Quadrupole) Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **24**, 1653-67.
- Gude N.M., Stevenson J.L., Rogers S., Best J.D., Kalionis B., Huisman M.A., Erwich J.J., Timmer A. & King R.G. (2003) GLUT12 expression in human placenta in first trimester and term. *Placenta* **24**, 566-70.
- Habermann M. & Gouveia N. (2014) Socioeconomic position and low birth weight among mothers exposed to traffic-related air pollution. *PLoS One* **9**, e113900.
- Halasz M. & Szekeres-Bartho J. (2013) The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* **97**, 43-50.
- Hales C.N. & Barker D.J. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**, 595-601.
- Hales C.N. & Barker D.J. (2001) The thrifty phenotype hypothesis. Br Med Bull 60, 5-20.
- Hanafi M.Y., Saleh M.M., Saad M.I., Abdelkhalek T.M. & Kamel M.A. (2016) Transgenerational effects of obesity and malnourishment on diabetes risk in F2 generation. *Mol Cell Biochem* **412**, 269-80.
- Hediger M.A., Romero M.F., Peng J.B., Rolfs A., Takanaga H. & Bruford E.A. (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch* **447**, 465-8.
- Hemmingsen J.G., Hougaard K.S., Talsness C., Wellejus A., Loft S., Wallin H. & Moller P. (2009) Prenatal exposure to diesel exhaust particles and effect on the male reproductive system in mice. *Toxicology* 264, 61-8.
- Henson M.C., Swan K.F. & O'Neil J.S. (1998) Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* **92**, 1020-8.
- Herd H., Daum N., Jones A.T., Huwer H., Ghandehari H. & Lehr C.M. (2013) Nanoparticle geometry and surface orientation influence mode of cellular uptake. *ACS Nano* **7**, 1961-73.
- Herrera E. & Ortega-Senovilla H. (2014) Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth. *Curr Pharm Biotechnol* **15**, 24-31.
- Higgins J.S., Vaughan O.R., Fernandez de Liger E., Fowden A.L. & Sferruzzi-Perri A.N. (2016) Placental phenotype and resource allocation to fetal growth are modified by the timing and degree of hypoxia during mouse pregnancy. *J Physiol* **594**, 1341-56.
- Hill D.J., Fekete M., Milner R.D.G., De Prins R. & Van Assche A. (1983) Reduced plasma somatomedin activity during experimental growth retardation in the fetal and neonatal rat. *Spencer EM*

(ed) Insulin-Like Growth Factors/Somatomedins. Basic Chemistry, Biology and Clinical Importance, 345-52.

- Hill D.J. & Milner R.D.G. (1985) Insulin as a Growth-Factor. Pediatric Research 19, 879-86.
- Hnit S.S., Xie C., Yao M., Holst J., Bensoussan A., De Souza P., Li Z. & Dong Q. (2015) p27(Kip1) signaling: Transcriptional and post-translational regulation. *Int J Biochem Cell Biol* **68**, 9-14.
- Hong J.S., Park M.K., Kim M.S., Lim J.H., Park G.J., Maeng E.H., Shin J.H., Kim M.K., Jeong J., Park J.A., Kim J.C. & Shin H.C. (2014a) Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. *Int J Nanomedicine* **9 Suppl 2**, 159-71.
- Hong J.S., Park M.K., Kim M.S., Lim J.H., Park G.J., Maeng E.H., Shin J.H., Kim Y.R., Kim M.K., Lee J.K., Park J.A., Kim J.C. & Shin H.C. (2014b) Effect of zinc oxide nanoparticles on dams and embryofetal development in rats. *Int J Nanomedicine* **9 Suppl 2**, 145-57.
- Hougaard K.S., Jackson P., Kyjovska Z.O., Birkedal R.K., De Temmerman P.J., Brunelli A., Verleysen E., Madsen A.M., Saber A.T., Pojana G., Mast J., Marcomini A., Jensen K.A., Wallin H., Szarek J., Mortensen A. & Vogel U. (2013) Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. *Reprod Toxicol* **41**, 86-97.
- Hougaard K.S., Jensen K.A., Nordly P., Taxvig C., Vogel U., Saber A.T. & Wallin H. (2008) Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol* **5**, 3.
- Houghton L.C., Ester W.A., Lumey L.H., Michels K.B., Wei Y., Cohn B.A., Susser E.S. & Terry M.B. (2016) Maternal weight gain in excess of pregnancy guidelines is related to daughters being overweight 40 years later. *Am J Obstet Gynecol.*
- Huang J.P., Hsieh P.C.H., Chen C.Y., Wang T.Y., Chen P.C., Liu C.C., Chen C.C. & Chen C.P. (2015) Nanoparticles can cross mouse placenta and induce trophoblast apoptosis. *Placenta* **36**, 1433-41.
- Huxley R.R., Shiell A.W. & Law C.M. (2000) The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *Journal of Hypertension* **18**, 815-31.
- Illsley N.P. (2000) Glucose transporters in the human placenta. *Placenta* 21, 14-22.
- Imtenan S., Varman M., Masjuki H.H., Kalam M.A., Sajjad H., Arbab M.I. & Fattah I.M.R. (2014) Impact of low temperature combustion attaining strategies on diesel engine emissions for diesel and biodiesels: A review. *Energy Conversion and Management* 80, 329-56.
- Innis S.M. (1991) Essential fatty acids in growth and development. Prog Lipid Res 30, 39-103.
- INSERM, KANTAR HEALTH & ROCHE (2012) Obépi. URL <u>http://www.roche.fr/innovation-recherche-</u> <u>medicale/decouverte-scientifique-medicale/cardio-metabolisme/enquete-nationale-obepi-</u> 2012.html.
- Jacquier V., Estelle J., Schmaltz-Panneau B., Lecardonnel J., Moroldo M., Lemonnier G., Turner-Maier J., Duranthon V., Oswald I.P., Gidenne T. & Rogel-Gaillard C. (2015) Genome-wide immunity studies in the rabbit: transcriptome variations in peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation by LPS or PMA-lonomycin. *BMC Genomics* 16, 26.
- Janssen B.G., Godderis L., Pieters N., Poels K., Kicinski M., Cuypers A., Fierens F., Penders J., Plusquin M., Gyselaers W. & Nawrot T.S. (2013) Placental DNA hypomethylation in association with particulate air pollution in early life. *Part Fibre Toxicol* **10**, 22.
- Jansson N., Pettersson J., Haafiz A., Ericsson A., Palmberg I., Tranberg M., Ganapathy V., Powell T.L. & Jansson T. (2006) 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**, 935-46.
- Jiang S. & Tang D.D. (2015) Plk1 regulates MEK1/2 and proliferation in airway smooth muscle cells. *Respir Res* 16, 93.
- Jimenez-Chillaron J.C., Isganaitis E., Charalambous M., Gesta S., Pentinat-Pelegrin T., Faucette R.R., Otis J.P., Chow A., Diaz R., Ferguson-Smith A. & Patti M.E. (2009) Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes* **58**, 460-8.

- Johnsen G.M., Weedon-Fekjaer M.S., Tobin K.A., Staff A.C. & Duttaroy A.K. (2009) Long-chain polyunsaturated fatty acids stimulate cellular fatty acid uptake in human placental choriocarcinoma (BeWo) cells. *Placenta* **30**, 1037-44.
- Jones H.N., Woollett L.A., Barbour N., Prasad P.D., Powell T.L. & 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**, 271-8.
- Jones S. & Brannon P.M. (2013) Differential gene regulation by nutrient restriction and hypoxia in cultured human placental extravillous trophoblasts (HTR-8/SVneo). *Faseb Journal* **27**.
- Juaneda P. & Rocquelin G. (1985) Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* **20**, 40-1.
- Kang J.H., Song H., Yoon J.A., Park D.Y., Kim S.H., Lee K.J., Farina A., Cho Y.K., Kim Y.N., Park S.W., Kim G.J., Shim S.H. & Cha D.H. (2011) Preeclampsia leads to dysregulation of various signaling pathways in placenta. *Journal of Hypertension* 29, 928-36.
- Kaufmann P., Mayhew T.M. & Charnock-Jones D.S. (2004) Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* **25**, 114-26.
- Kavitha J.V., Rosario F.J., Nijland M.J., McDonald T.J., Wu G., Kanai Y., Powell T.L., Nathanielsz P.W. & Jansson T. (2014) Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon. FASEB J 28, 1294-305.
- Kermack W.O., McKendrick A.G. & McKinlay P.L. (1934) Death-rates in Great Britain and Sweden: Expression of Specific Mortality Rates as Products of Two Factors, and some Consequences thereof. J Hyg (Lond) 34, 433-57.
- Kevorkova O., Ethier-Chiasson M. & Lafond J. (2007) Differential expression of glucose transporters in rabbit placenta: effect of hypercholesterolemia in dams. *Biol Reprod* **76**, 487-95.
- Khaliq A., Dunk C., Jiang J., Shams M., Li X.F., Acevedo C., Weich H., Whittle M. & Ahmed A. (1999) Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction upregulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. Lab Invest **79**, 151-70.
- Khaliq A., Li X.F., Shams M., Sisi P., Acevedo C.A., Whittle M.J., Weich H. & Ahmed A. (1996) Localisation of placenta growth factor (PIGF) in human term placenta. *Growth Factors* **13**, 243-50,color plates I-II,pre bk cov.
- Khan H., Kusakabe K.T., Wakitani S., Hiyama M. & Kiso Y. (2011) Quantitative expression and immunohistochemical detection of glucose transporters, GLUT1 and GLUT3 in the rabbit placenta during successful pregnancy. *J Vet Med Sci* **73**, 1177-83.
- King M.W. (1996-2016) The medical biochemistry page. URL <u>http://themedicalbiochemistrypage.org/eicosanoids.php</u>.
- Kloet S.K., Walczak A.P., Louisse J., van den Berg H.H., Bouwmeester H., Tromp P., Fokkink R.G. & Rietjens I.M. (2015) Translocation of positively and negatively charged polystyrene nanoparticles in an in vitro placental model. *Toxicol In Vitro* **29**, 1701-10.
- Knipp G.T., Liu B., Audus K.L., Fujii H., Ono T. & Soares M.J. (2000) Fatty acid transport regulatory proteins in the developing rat placenta and in trophoblast cell culture models. *Placenta* 21, 367-75.
- Knoth M. (1968) Ultrastructure of chorionic villi from a four-somite human embryo. *J Ultrastruct Res* **25**, 423-40.
- Knudsen T.B. & Green M.L. (2004) Response characteristics of the mitochondrial DNA genome in developmental health and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* **72**, 313-29.
- Koletzko B., Larque E. & Demmelmair H. (2007) Placental transfer of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). *J Perinat Med* **35 Suppl 1**, S5-11.
- Kusinski L.C., Dilworth M.R., Baker P.N., Sibley C.P., Wareing M. & Glazier J.D. (2011) System A activity and vascular function in the placental-specific Igf2 knockout mouse. *Placenta* **32**, 871-6.

- Kyjovska Z.O., Boisen A.M., Jackson P., Wallin H., Vogel U. & Hougaard K.S. (2013) Daily sperm production: application in studies of prenatal exposure to nanoparticles in mice. *Reprod Toxicol* **36**, 88-97.
- Kyjovska Z.O., Jacobsen N.R., Saber A.T., Bengtson S., Jackson P., Wallin H. & Vogel U. (2015) DNA strand breaks, acute phase response and inflammation following pulmonary exposure by instillation to the diesel exhaust particle NIST1650b in mice. *Mutagenesis* **30**, 499-507.
- Lager S. & Powell T.L. (2012) Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy* **2012**, 179827.
- Lager S., Ramirez V.I., Gaccioli F., Jang B., Jansson T. & Powell T.L. (2016) Protein expression of fatty acid transporter 2 is polarized to the trophoblast basal plasma membrane and increased in placentas from overweight/obese women. *Placenta* **40**, 60-6.
- Lakshmanan A., Chiu Y.H., Coull B.A., Just A.C., Maxwell S.L., Schwartz J., Gryparis A., Kloog I., Wright R.J. & Wright R.O. (2015) Associations between prenatal traffic-related air pollution exposure and birth weight: Modification by sex and maternal pre-pregnancy body mass index. *Environ Res* **137**, 268-77.
- Langley-Evans S.C. (2000) Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int J Food Sci Nutr* **51**, 11-7.
- Langley-Evans S.C., Welham S.J., Sherman R.C. & Jackson A.A. (1996) Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)* **91**, 607-15.
- Larcombe A.N., Phan J.A., Kicic A., Perks K.L., Mead-Hunter R. & Mullins B.J. (2014) Route of exposure alters inflammation and lung function responses to diesel exhaust. *Inhal Toxicol* **26**, 409-18.
- Larque E., Demmelmair H., Klingler M., De Jonge S., Bondy B. & Koletzko B. (2006) Expression pattern of fatty acid transport protein-1 (FATP-1), FATP-4 and heart-fatty acid binding protein (H-FABP) genes in human term placenta. *Early Hum Dev* **82**, 697-701.
- Larque E., Ruiz-Palacios M. & Koletzko B. (2013) Placental regulation of fetal nutrient supply. *Curr* Opin Clin Nutr Metab Care **16**, 292-7.
- Larsen J.F. (1962) Electron microscopy of the chorioallantoic placenta of the rabbit The placental labyrinth and the multinucleated giant cells of the intermediate zone. *J. Ultrastructure research* **7**, 535-49.
- Laskin D.L., Mainelis G., Turpin B.J., Patel K.J., Sunil V.R. & Committee H.E.I.H.R. (2010) Pulmonary effects of inhaled diesel exhaust in young and old mice: a pilot project. *Res Rep Health Eff Inst*, 3-31.
- Lavigne E., Yasseen A.S., 3rd, Stieb D.M., Hystad P., van Donkelaar A., Martin R.V., Brook J.R., Crouse D.L., Burnett R.T., Chen H., Weichenthal S., Johnson M., Villeneuve P.J. & Walker M. (2016) Ambient air pollution and adverse birth outcomes: Differences by maternal comorbidities. *Environ Res* 148, 457-66.
- Lavoie P.M., Qing H.A., Jolette E., Whalen M., Nuyt A.M., Audibert F., Speert D.P., Lacaze-Masmonteil T., Soudeyns H. & Kollmann T.R. (2010) Profound Lack of Interleukin (IL)-12/IL-23p40 in Neonates Born Early in Gestation Is Associated with an Increased Risk of Sepsis. *Journal of Infectious Diseases* 202, 1754-63.
- Law C.M., Barker D.J., Osmond C., Fall C.H. & Simmonds S.J. (1992) Early growth and abdominal fatness in adult life. *J Epidemiol Community Health* **46**, 184-6.
- Law C.M. & Shiell A.W. (1996) Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *Journal of Hypertension* **14**, 935-41.
- Le Bouteiller P. (2014) Immunologie de la grossesse: un dialogue bénéfique, programmé entre la mère et le foetus. In: *La reproduction animale et humain* (ed. by Quae).
- Le Bouteiller P. & Sargent I.L. (2000) HLA class I molecules in the placenta: which ones, where and what for? A workshop report. *Placenta* **21 Suppl A**, S93-6.
- Le S., Josse J. & Husson F. (2008) FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* **25**, 1-18.

- Lee H.S. (2015) Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. *Nutrients* **7**, 9492-507.
- Lee J.J., Lambert J.E., Hovhannisyan Y., Ramos-Roman M.A., Trombold J.R., Wagner D.A. & Parks E.J. (2015) Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am J Clin Nutr* **101**, 34-43.
- Lepercq J., Catalano P. & Hauguel de Mouzon S. (2007) [Leptin in pregnancy: facts, questions and future]. *Gynecol Obstet Fertil* **35**, 89-95.
- Levy M., Luciani N., Alloyeau D., Elgrabli D., Deveaux V., Pechoux C., Chat S., Wang G., Vats N., Gendron F., Factor C., Lotersztajn S., Luciani A., Wilhelm C. & Gazeau F. (2011) Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 32, 3988-99.
- Li C., Li X., Suzuki A.K., Zhang Y., Fujitani Y., Nagaoka K., Watanabe G. & Taya K. (2013) Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. *J Reprod Dev* **59**, 145-50.
- Li C., Taneda S., Taya K., Watanabe G., Li X., Fujitani Y., Nakajima T. & Suzuki A.K. (2009) Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats. *Toxicol Lett* **185**, 1-8.
- Li R., Ning Z., Majumdar R., Cui J., Takabe W., Jen N., Sioutas C. & Hsiai T. (2010a) Ultrafine particles from diesel vehicle emissions at different driving cycles induce differential vascular proinflammatory responses: implication of chemical components and NF-kappaB signaling. *Part Fibre Toxicol* **7**, 6.
- Li Y., He Y., Qi L., Jaddoe V.W., Feskens E.J., Yang X., Ma G. & Hu F.B. (2010b) Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hyperglycemia and type 2 diabetes in adulthood. *Diabetes* **59**, 2400-6.
- Li Y.Q., Yan H. & Bai B. (2008) Change in iron transporter expression in human term placenta with different maternal iron status. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **140**, 48-54.
- Liati A. & Eggenschwiler P.D. (2010) Characterization of particulate matter deposited in diesel particulate filters: Visual and analytical approach in macro-, micro- and nano-scales. *Combustion and Flame* **157**, 1658-70.
- Lillycrop K.A. (2011) Effect of maternal diet on the epigenome: implications for human metabolic disease. *Proc Nutr Soc* **70**, 64-72.
- Lillycrop K.A. & Burdge G.C. (2011) The effect of nutrition during early life on the epigenetic regulation of transcription and implications for human diseases. J Nutrigenet Nutrigenomics 4, 248-60.
- Lindsay K.L., Hellmuth C., Uhl O., Buss C., Wadhwa P.D., Koletzko B. & Entringer S. (2015) Longitudinal Metabolomic Profiling of Amino Acids and Lipids across Healthy Pregnancy. *PLoS One* **10**, e0145794.
- Livneh I., Cohen-Kaplan V., Cohen-Rosenzweig C., Avni N. & Ciechanover A. (2016) The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Research* **26**, 869-85.
- Lorente-Cebrian S., Costa A.G.V., Navas-Carretero S., Zabala M., Martinez J.A. & Moreno-Aliaga M.J. (2013) Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *Journal of Physiology and Biochemistry* **69**, 633-51.
- Lucas A. (1998) Programming by early nutrition: an experimental approach. J Nutr 128, 401S-6S.
- Luo X., Pan J., Wang L., Wang P., Zhang M., Liu M., Dong Z., Meng Q., Tao X., Zhao X., Zhong J., Ju W., Gu Y., Jenkins E.C., Brown W.T., Shi Q. & Zhong N. (2015) Epigenetic regulation of IncRNA connects ubiquitin-proteasome system with infection-inflammation in preterm births and preterm premature rupture of membranes. *BMC Pregnancy Childbirth* **15**, 35.
- Ma J.Y., Young S.H., Mercer R.R., Barger M., Schwegler-Berry D., Ma J.K. & Castranova V. (2014) Interactive effects of cerium oxide and diesel exhaust nanoparticles on inducing pulmonary fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* **278**, 135-47.
- Ma Y., Zhu M.J., Zhang L., Hein S.M., Nathanielsz P.W. & 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 Regul Integr Comp Physiol* **299**, R249-58.

- Mahajan S.D., Aalinkeel R., Singh S., Shah P., Gupta N. & Kochupillai N. (2006) Endocrine regulation in asymmetric intrauterine fetal growth retardation. *J Matern Fetal Neonatal Med* **19**, 615-23.
- Malina R.M., Katzmarzyk P.T. & Beunen G. (1996) Birth weight and its relationship to size attained and relative fat distribution at 7 to 12 years of age. *Obes Res* **4**, 385-90.
- Manners S., Alam R., Schwartz D.A. & Gorska M.M. (2014) A mouse model links asthma susceptibility to prenatal exposure to diesel exhaust. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 63-72.
- Manning J. & Vehaskari V.M. (2001) Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol* **16**, 417-22.
- Maricq M.M. (2007) Chemical characterization of particulate emissions from diesel engines: A review. *Journal of Aerosol Science* **38**, 1079-118.
- Martensson L. (1984) The pregnant rabbit, guinea pig, sheep and rhesus monkey as models in reproductive physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **18**, 169-82.
- Martinez F., Olvera-Sanchez S., Esparza-Perusquia M., Gomez-Chang E. & Flores-Herrera O. (2015) Multiple functions of syncytiotrophoblast mitochondria. *Steroids* **103**, 11-22.
- Matter C.W.G.o.P. (2004) Second position paper on particulate matter.
- Mayer A., Czerwinski J., Wichser A., Ulrich A., Kasper M. & Mooney J. (2010) Metal-oxide particles in combustion engine exhaust. *SAE Technical Papers*.
- Mayhew T.M. (2002) Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. *Placenta* **23**, 742-50.
- Mazzucco M.B., Higa R., Capobianco E., Kurtz M., Jawerbaum A. & White V. (2013) Saturated fat-rich diet increases fetal lipids and modulates LPL and leptin receptor expression in rat placentas. *J Endocrinol* **217**, 303-15.
- McArdle H.J., Danzeisen R., Fosset C. & Gambling L. (2003) The role of the placenta in iron transfer from mother to fetus and the relationship between iron status and fetal outcome. *Biometals* **16**, 161-7.
- McCance R.A. (1976) Critical periods of growth. *Proc Nutr Soc* **35**, 309-13.
- Miller J.B. (1998) Rabbits. In: Encyclopedia of Reproduction (eds. by Knobil E & Neill JD), pp. 173-81.
- Mills N.L., Miller M.R., Lucking A.J., Beveridge J., Flint L., Boere A.J., Fokkens P.H., Boon N.A., Sandstrom T., Blomberg A., Duffin R., Donaldson K., Hadoke P.W., Cassee F.R. & Newby D.E. (2011) Combustion-derived nanoparticulate induces the adverse vascular effects of diesel exhaust inhalation. *Eur Heart J* 32, 2660-71.
- Miranda-Sayago J.M., Fernandez-Arcas N., Reyes-Engel A., Benito C., Narbona I. & Alonso A. (2012) Changes in CDKN2D, TP53, and miR125a expression: potential role in the evaluation of human amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cell fitness. *Genes Cells* **17**, 673-87.
- Mitchell M.D., Peiris H.N., Kobayashi M., Koh Y.Q., Duncombe G., Illanes S.E., Rice G.E. & Salomon C. (2015) Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **213**, S173-81.
- Mohammadipour A., Fazel A., Haghir H., Motejaded F., Rafatpanah H., Zabihi H., Hosseini M. & Bideskan A.E. (2014) Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring. *Environ Toxicol Pharmacol* 37, 617-25.

Monde L.

- Monniaux D., Caraty A., Clement F., Dalbiès-Tran R., Dupont J., Fabre S., Gérard N., Mermillod P., Monget P. & Uzbekova S. (2009) Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *Inra Prod. Anim, INRA* **22**, 59-76.
- Muoth C., Aengenheister L., Kucki M., Wick P. & Buerki-Thurnherr T. (2016) Nanoparticle transport across the placental barrier: pushing the field forward! *Nanomedicine (Lond)* **11**, 941-57.
- Myllynen P.K., Loughran M.J., Howard C.V., Sormunen R., Walsh A.A. & Vahakangas K.H. (2008) Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol* **26**, 130-7.
- News B.B.C. (2015) Australia approves controversial Carmichael coal mine. URL <u>http://www.bbc.com/news/world-australia-34535947</u>.

- Ogden C.L., Carroll M.D., Fryar C.D. & Flegal K.M. (2015) Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2011-2014. *NCHS Data Brief*, 1-8.
- Ogden C.L., Carroll M.D., Kit B.K. & Flegal K.M. (2012) Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. *JAMA* **307**, 483-90.
- Ogden C.L., Flegal K.M., Carroll M.D. & Johnson C.L. (2002) Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *JAMA* **288**, 1728-32.
- Ogden C.L., Yanovski S.Z., Carroll M.D. & Flegal K.M. (2007) The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* **132**, 2087-102.
- Ogliari K.S., Lichtenfels A.J., de Marchi M.R., Ferreira A.T., Dolhnikoff M. & Saldiva P.H. (2013) Intrauterine exposure to diesel exhaust diminishes adult ovarian reserve. *Fertil Steril* **99**, 1681-8.
- Okosun I.S., Liao Y., Rotimi C.N., Dever G.E. & Cooper R.S. (2000) Impact of birth weight on ethnic variations in subcutaneous and central adiposity in American children aged 5-11 years. A study from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**, 479-84.
- Olsson D., Mogren I., Eneroth K. & Forsberg B. (2015) Traffic pollution at the home address and pregnancy outcomes in Stockholm, Sweden. *BMJ Open* **5**, e007034.
- OMS (2005) Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air: particles, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre. Mise à jour mondiale 2005. In: *Synthèse de l'évaluation des risques*.
- Ono N., Oshio S., Niwata Y., Yoshida S., Tsukue N., Sugawara I., Takano H. & Takeda K. (2008) Detrimental effects of prenatal exposure to filtered diesel exhaust on mouse spermatogenesis. *Arch Toxicol* **82**, 851-9.
- Organization W.H. (2016) WHO Global urban ambient air pollution database. URL <u>http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/databases/cities/en/</u>.
- Orozco-Solis R., Matos R.J., Guzman-Quevedo O., Lopes de Souza S., Bihouee A., Houlgatte R., Manhaes de Castro R. & Bolanos-Jimenez F. (2010) Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PLoS One* **5**, e13537.
- Osmond C., Barker D.J., Winter P.D., Fall C.H. & Simmonds S.J. (1993) Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* **307**, 1519-24.
- Osol G. & Mandala M. (2009) Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology* (*Bethesda*) **24**, 58-71.
- Ozanne S.E. & Constancia M. (2007) Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**, 539-46.
- Padula A.M., Mortimer K.M., Tager I.B., Hammond S.K., Lurmann F.W., Yang W., Stevenson D.K. & Shaw G.M. (2014) Traffic-related air pollution and risk of preterm birth in the San Joaquin Valley of California. Ann Epidemiol 24, 888-95e4.
- Painter R.C., Osmond C., Gluckman P., Hanson M., Phillips D.I. & Roseboom T.J. (2008) Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG* **115**, 1243-9.
- Painter R.C., Roseboom T.J. & Bleker O.P. (2005) Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* **20**, 345-52.
- Palii S.S., Chen H. & Kilberg M.S. (2004) Transcriptional control of the human sodium-coupled neutral amino acid transporter system a gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 3463-71.
- Pang W.W. & Hartmann P.E. (2007) Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**, 211-21.
- Parif A. (2010) Les critères nationaux de qualité de l'air. URL <u>http://www.airparif.asso.fr/reglementation/normes-francaises</u>.
- Park H.K. & Ahima R.S. (2015) Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism* **64**, 24-34.

- Park J.H., Stoffers D.A., Nicholls R.D. & 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**, 2316-24.
- Parsons T.J., Power C. & Manor O. (2001) Fetal and early life growth and body mass index from birth to early adulthood in 1958 British cohort: longitudinal study. *BMJ* **323**, 1331-5.
- Patterson E., Wall R., Fitzgerald G.F., Ross R.P. & Stanton C. (2012) Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metab* **2012**, 539426.
- Pedersen M., Giorgis-Allemand L., Bernard C., Aguilera I., Andersen A.M., Ballester F., Beelen R.M., Chatzi L., Cirach M., Danileviciute A., Dedele A., Eijsden M., Estarlich M., Fernandez-Somoano A., Fernandez M.F., Forastiere F., Gehring U., Grazuleviciene R., Gruzieva O., Heude B., Hoek G., de Hoogh K., van den Hooven E.H., Haberg S.E., Jaddoe V.W., Klumper C., Korek M., Kramer U., Lerchundi A., Lepeule J., Nafstad P., Nystad W., Patelarou E., Porta D., Postma D., Raaschou-Nielsen O., Rudnai P., Sunyer J., Stephanou E., Sorensen M., Thiering E., Tuffnell D., Varro M.J., Vrijkotte T.G., Wijga A., Wilhelm M., Wright J., Nieuwenhuijsen M.J., Pershagen G., Brunekreef B., Kogevinas M. & Slama R. (2013) Ambient air pollution and low birthweight: a European cohort study (ESCAPE). *Lancet Respir Med* 1, 695-704.
- Pentinat T., Ramon-Krauel M., Cebria J., Diaz R. & Jimenez-Chillaron J.C. (2010) Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition. *Endocrinology* **151**, 5617-23.
- Pere M.C. (2003) Materno-foetal exchanges and utilisation of nutrients by the foetus: comparison between species. *Reprod Nutr Dev* **43**, 1-15.
- Petitjean O. (2016) Hazelwood: quel avenir pour la centrale au charbon inavouable d'Engie en Australie? URL <u>http://multinationales.org/Hazelwood-quel-avenir-pour-la-centrale-aucharbon-inavouable-d-Engie-en</u>.
- Phipps E., Prasanna D., Brima W. & Jim B. (2016) Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. *Clin J Am Soc Nephrol* **11**, 1102-13.
- Picone O., Laigre P., Fortun-Lamothe L., Archilla C., Peynot N., Ponter A.A., Berthelot V., Cordier A.G., Duranthon V. & 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**, 287-99.
- Pijnenborg R., Vercruysse L. & Hanssens M. (2006) The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* **27**, 939-58.
- Popovicheva O., Engling G., Lin K.T., Persiantseva N., Timofeev M., Kireeva E., Volk P., Hubert A. & Wachtmeister G. (2015) Diesel/biofuel exhaust particles from modern internal combustion engines: Microstructure, composition, and hygroscopicity. *Fuel* **157**, 232-9.
- Portrait F., Teeuwiszen E. & Deeg D. (2011) Early life undernutrition and chronic diseases at older ages: the effects of the Dutch famine on cardiovascular diseases and diabetes. *Soc Sci Med* **73**, 711-8.
- Qi W., Bi J., Zhang X., Wang J., Wang J., Liu P., Li Z. & Wu W. (2014) Damaging effects of multi-walled carbon nanotubes on pregnant mice with different pregnancy times. *Sci Rep* **4**, 4352.
- Rahmalia A., Giorgis-Allemand L., Lepeule J., Philippat C., Galineau J., Hulin A., Charles M.A., Slama R.
 & group E.M.-C.C.S. (2012) Pregnancy exposure to atmospheric pollutants and placental weight: an approach relying on a dispersion model. *Environ Int* 48, 47-55.
- Rajender S., Avery K. & Agarwal A. (2011) Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res* **727**, 62-71.
- Rattanapinyopituk K., Shimada A., Morita T., Sakurai M., Asano A., Hasegawa T., Inoue K. & Takano H.
 (2014) Demonstration of the Clathrin- and Caveolin-Mediated Endocytosis at the Maternal-Fetal Barrier in Mouse Placenta after Intravenous Administration of Gold Nanoparticles. *Journal of Veterinary Medical Science* **76**, 377-87.
- Ravelli A.C., van Der Meulen J.H., Osmond C., Barker D.J. & Bleker O.P. (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* **70**, 811-6.

- Redmer D.A., Luther J.S., Milne J.S., Aitken R.P., Johnson M.L., Borowicz P.P., Borowicz M.A., Reynolds L.P. & Wallace J.M. (2009) Fetoplacental growth and vascular development in overnourished adolescent sheep at day 50, 90 and 130 of gestation. *Reproduction* **137**, 749-57.
- Refuerzo J.S., Godin B., Bishop K., Srinivasan S., Shah S.K., Amra S., Ramin S.M. & Ferrari M. (2011) Size of the nanovectors determines the transplacental passage in pregnancy: study in rats. *Am J Obstet Gynecol* **204**, 546 e5-9.
- Regnault N., Botton J., Forhan A., Hankard R., Thiebaugeorges O., Hillier T.A., Kaminski M., Heude B.
 & Charles M.A. (2010) Determinants of early ponderal and statural growth in full-term infants in the EDEN mother-child cohort study. *Am J Clin Nutr* 92, 594-602.
- Regnault T.R., Friedman J.E., Wilkening R.B., Anthony R.V. & Hay W.W., Jr. (2005) Fetoplacental transport and utilization of amino acids in IUGR--a review. *Placenta* **26 Suppl A**, S52-62.
- Regnault T.R., Galan H.L., Parker T.A. & Anthony R.V. (2002) Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review. *Placenta* **23 Suppl A**, S119-29.
- Reshetnikova O.S., Burton G.J. & Milovanov A.P. (1994) Effects of hypobaric hypoxia on the fetoplacental unit: the morphometric diffusing capacity of the villous membrane at high altitude. *Am J Obstet Gynecol* **171**, 1560-5.
- Reynolds C.M., Vickers M.H., Harrison C.J., Segovia S.A. & Gray C. (2015) Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. *Physiol Rep* **3**.
- Reynolds L.P., Borowicz P.P., Vonnahme K.A., Johnson M.L., Grazul-Bilska A.T., Redmer D.A. & Caton J.S. (2005) Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J Physiol* **565**, 43-58.
- Reynolds L.P. & Redmer D.A. (1995) Utero-placental vascular development and placental function. *J* Anim Sci **73**, 1839-51.
- Risau W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. Nature 386, 671-4.
- Risau W. & Flamme I. (1995) Vasculogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology **11**, 73-91.
- Ritz B., Qiu J., Lee P.C., Lurmann F., Penfold B., Erin Weiss R., McConnell R., Arora C., Hobel C. & Wilhelm M. (2014) Prenatal air pollution exposure and ultrasound measures of fetal growth in Los Angeles, California. *Environ Res* **130**, 7-13.
- Roberts C.T., Sohlstrom A., Kind K.L., Earl R.A., Khong T.Y., Robinson J.S., Owens P.C. & Owens J.A. (2001) Maternal food restriction reduces the exchange surface area and increases the barrier thickness of the placenta in the guinea-pig. *Placenta* 22, 177-85.
- Rodriguez-Trejo A., Ortiz-Lopez M.G., Zambrano E., Granados-Silvestre Mde L., Mendez C., Blondeau B., Breant B., Nathanielsz P.W. & Menjivar M. (2012) Developmental programming of neonatal pancreatic beta-cells by a maternal low-protein diet in rats involves a switch from proliferation to differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E1431-9.
- Romao R., Pereira L.A., Saldiva P.H., Pinheiro P.M., Braga A.L. & Martins L.C. (2013) The relationship between low birth weight and exposure to inhalable particulate matter. *Cad Saude Publica* 29, 1101-8.
- Roos S., Jansson N., Palmberg I., Saljo K., Powell T.L. & Jansson T. (2007) Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. J Physiol 582, 449-59.
- Roos S., Kanai Y., Prasad P.D., Powell T.L. & Jansson T. (2009a) Regulation of placental amino acid transporter activity by mammalian target of rapamycin. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C142-50.
- Roos S., Powell T.L. & Jansson T. (2009b) Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. *Biochem Soc Trans* **37**, 295-8.
- Rosario F.J., Jansson N., Kanai Y., Prasad P.D., Powell T.L. & Jansson T. (2011) Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. *Endocrinology* **152**, 1119-29.

- Rosario F.J., Kanai Y., Powell T.L. & Jansson T. (2015) Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth. *Obesity (Silver Spring)* **23**, 1663-70.
- Roseboom T.J., van der Meulen J.H., Ravelli A.C., Osmond C., Barker D.J. & Bleker O.P. (2001) Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Twin Res* 4, 293-8.
- Rousseau D., Helies-Toussaint C., Moreau D., Raederstorff D. & Grynberg A. (2003) Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H1294-302.
- Russo G.L. (2009) Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology* **77**, 937-46.
- Sabapatha A., Gercel-Taylor C. & Taylor D.D. (2006) Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol* **56**, 345-55.
- Saber A.T., Jacobsen N.R., Jackson P., Poulsen S.S., Kyjovska Z.O., Halappanavar S., Yauk C.L., Wallin H. & Vogel U. (2014) Particle-induced pulmonary acute phase response may be the causal link between particle inhalation and cardiovascular disease. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 6, 517-31.
- Saber A.T., Lamson J.S., Jacobsen N.R., Ravn-Haren G., Hougaard K.S., Nyendi A.N., Wahlberg P., Madsen A.M., Jackson P., Wallin H. & Vogel U. (2013) Particle-induced pulmonary acute phase response correlates with neutrophil influx linking inhaled particles and cardiovascular risk. *PLoS One* **8**, e69020.
- Saifi B., Rezaee S.A., Tajik N., Ahmadpour M.E., Ashrafi M., Vakili R., SoleimaniAsl S., Aflatoonian R. & Mehdizadeh M. (2014) Th17 cells and related cytokines in unexplained recurrent spontaneous miscarriage at the implantation window. *Reprod Biomed Online* **29**, 481-9.
- Sakamoto M. & Kubota M. (2004) Plasma fatty acid profiles in 37 pairs of maternal and umbilical cord blood samples. *Environ Health Prev Med* **9**, 67-9.
- Samaras Z., Ntziachristos L., Thompson N., Hall D., Westerholm R. & Boulter P. (2005) Characterisation of exhaust particulate emissions from road vehicles (PARTICULATES).
- Sandovici I., Hoelle K., Angiolini E. & Constancia M. (2012) Placental adaptations to the maternal-fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. *Reprod Biomed Online* **25**, 68-89.
- Sandovici I., Smith N.H., Nitert M.D., Ackers-Johnson M., Uribe-Lewis S., Ito Y., Jones R.H., Marquez V.E., Cairns W., Tadayyon M., O'Neill L.P., Murrell A., Ling C., Constancia M. & Ozanne S.E. (2011) Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5449-54.
- Schubring C., Kiess W., Englaro P., Rascher W., Dotsch J., Hanitsch S., Attanasio A. & Blum W.F. (1997) Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1480-3.
- Semmler-Behnke M., Lipka J., Wenk A., Hirn S., Schaffler M., Tian F., Schmid G., Oberdorster G. & Kreyling W.G. (2014) Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Part Fibre Toxicol* **11**, 33.
- Senaris R., Garcia-Caballero T., Casabiell X., Gallego R., Castro R., Considine R.V., Dieguez C. & Casanueva F.F. (1997) Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* **138**, 4501-4.
- 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., Constancia M. & Fowden A.L. (2013) An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory. *Faseb Journal* **27**, 3928-37.
- Sharkhuu T., Doerfler D.L., Krantz Q.T., Luebke R.W., Linak W.P. & Gilmour M.I. (2010) Effects of prenatal diesel exhaust inhalation on pulmonary inflammation and development of specific immune responses. *Toxicol Lett* **196**, 12-20.
- Shaw C.A., Mortimer G.M., Deng Z.J., Carter E.S., Connell S.P., Miller M.R., Duffin R., Newby D.E., Hadoke P.W. & Minchin R.F. (2016) Protein corona formation in bronchoalveolar fluid

enhances diesel exhaust nanoparticle uptake and pro-inflammatory responses in macrophages. *Nanotoxicology* **10**, 981-91.

- Shimizu R., Umezawa M., Okamoto S., Onoda A., Uchiyama M., Tachibana K., Watanabe S., Ogawa S., Abe R. & Takeda K. (2014) Effect of maternal exposure to carbon black nanoparticle during early gestation on the splenic phenotype of neonatal mouse. *J Toxicol Sci* **39**, 571-8.
- Shin B.C., Fujikura K., Suzuki T., Tanaka S. & Takata K. (1997) Glucose transporter GLUT3 in the rat placental barrier: a possible machinery for the transplacental transfer of glucose. *Endocrinology* **138**, 3997-4004.
- Sibley C.P., Coan P.M., Ferguson-Smith A.C., Dean W., Hughes J., Smith P., Reik W., Burton G.J., Fowden A.L. & Constancia M. (2004) Placental-specific insulin-like growth factor 2 (lgf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8204-8.
- Sidle E.H., Casselman R. & Smith G.N. (2007) Effect of cigarette smoke on placental antioxidant enzyme expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R754-8.
- Singh R., Kalra R.S., Hasan K., Kaul Z., Cheung C.T., Huschtscha L., Reddel R.R., Kaul S.C. & Wadhwa R. (2014) Molecular characterization of collaborator of ARF (CARF) as a DNA damage response and cell cycle checkpoint regulatory protein. *Exp Cell Res* **322**, 324-34.
- Singhal A. & Lucas A. (2004) Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? Lancet 363, 1642-5.
- Singhal A., Wells J., Cole T.J., Fewtrell M. & Lucas A. (2003) Programming of lean body mass: a link between birth weight, obesity, and cardiovascular disease? *Am J Clin Nutr* **77**, 726-30.
- Sivertsen B. (2004) Air quality monitoring and management system in Ho Chi Minh, Viet Nam. BAQ Conference.
- Sivertsen B. & El Seoud A.A. (2004) The air pollution monitoring network for Egypt. *International Conference on Atmospheric Pollution*.
- Slama R., Bottagisi S., Solansky I., Lepeule J., Giorgis-Allemand L. & Sram R. (2013) Short-term impact of atmospheric pollution on fecundability. *Epidemiology* **24**, 871-9.
- Slama R., Morgenstern V., Cyrys J., Zutavern A., Herbarth O., Wichmann H.E., Heinrich J. & Group L.S. (2007) Traffic-related atmospheric pollutants levels during pregnancy and offspring's term birth weight: a study relying on a land-use regression exposure model. *Environ Health Perspect* **115**, 1283-92.
- Slama R., Thiebaugeorges O., Goua V., Aussel L., Sacco P., Bohet A., Forhan A., Ducot B., Annesi-Maesano I., Heinrich J., Magnin G., Schweitzer M., Kaminski M., Charles M.A. & Group E.M.-C.C.S. (2009) Maternal personal exposure to airborne benzene and intrauterine growth. *Environ Health Perspect* **117**, 1313-21.
- Sorensen H.T., Sabroe S., Rothman K.J., Gillman M., Fischer P. & Sorensen T.I.A. (1997) Relation between weight and length at birth and body mass index in young adulthood: cohort study. *British Medical Journal* **315**, 1137-.
- Steiner S., Bisig C., Petri-Fink A. & Rothen-Rutishauser B. (2016) Diesel exhaust: current knowledge of adverse effects and underlying cellular mechanisms. *Arch Toxicol* **90**, 1541-53.
- Steiner S., Mueller L., Popovicheva O.B., Raemy D.O., Czerwinski J., Comte P., Mayer A., Gehr P., Rothen-Rutishauser B. & Clift M.J. (2012) Cerium dioxide nanoparticles can interfere with the associated cellular mechanistic response to diesel exhaust exposure. *Toxicol Lett* **214**, 218-25.
- Stieb D.M., Chen L., Hystad P., Beckerman B.S., Jerrett M., Tjepkema M., Crouse D.L., Omariba D.W., Peters P.A., van Donkelaar A., Martin R.V., Burnett R.T., Liu S., Smith-Doiron M. & Dugandzic R.M. (2016) A national study of the association between traffic-related air pollution and adverse pregnancy outcomes in Canada, 1999-2008. *Environ Res* 148, 513-26.
- Stinn W., Teredesai A., Anskeit E., Rustemeier K., Schepers G., Schnell P., Haussmann H.J., Carchman R.A., Coggins C.R. & Reininghaus W. (2005) Chronic nose-only inhalation study in rats, comparing room-aged sidestream cigarette smoke and diesel engine exhaust. *Inhal Toxicol* 17, 549-76.

- Stump D.D., Zhou S.L. & Berk P.D. (1993) Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver. *Am J Physiol* **265**, G894-902.
- Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S. & Mesirov J.P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-50.
- Sumner S.C., Fennell T.R., Snyder R.W., Taylor G.F. & Lewin A.H. (2010) Distribution of carbon-14 labeled C60 ([14C]C60) in the pregnant and in the lactating dam and the effect of C60 exposure on the biochemical profile of urine. *J Appl Toxicol* **30**, 354-60.
- Suzuki T., Oshio S., Iwata M., Saburi H., Odagiri T., Udagawa T., Sugawara I., Umezawa M. & Takeda K.
 (2010) In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. *Part Fibre Toxicol* 7, 7.
- Tacchi L., Bickerdike R., Secombes C.J., Pooley N.J., Urquhart K.L., Collet B. & Martin S.A. (2010) Ubiquitin E3 ligase atrogin-1 (Fbox-32) in Atlantic salmon (Salmo salar): sequence analysis, genomic structure and modulation of expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 157, 364-73.
- Takata K., Kasahara T., Kasahara M., Ezaki O. & Hirano H. (1994) Immunolocalization of glucose transporter GLUT1 in the rat placental barrier: possible role of GLUT1 and the gap junction in the transport of glucose across the placental barrier. *Cell Tissue Res* **276**, 411-8.
- Takeda K., Suzuki K.I., Ishihara A., Kubo-Irie M., Fujimoto R., Tabata M., Oshio S., Nihei Y., Ihara T. & Sugamata M. (2009) Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems. *Journal of Health Science* **55**, 95-102.
- Tarrade A., Chavatte-Palmer P., Guillomot M., Camous S. & Evain-Brion D. (2014a) Le placenta. In: *La reproduction animale et humaine* (ed. by Quae).
- Tarrade A., Lecarpentier E., Gil S., Morel O., Zahr N., Dahirel M., Tsatsaris V. & Chavatte-Palmer P. (2014b) Analysis of placental vascularization in a pharmacological rabbit model of IUGR induced by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Placenta* 35, 254-9.
- Tarrade A., Rousseau-Ralliard D., Aubriere M.C., Peynot N., Dahirel M., Bertrand-Michel J., Aguirre-Lavin T., Morel O., Beaujean N., Duranthon V. & 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.
- Tarry-Adkins J.L., Chen J.H., Jones R.H., Smith N.H. & Ozanne S.E. (2010) Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity, and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life. *FASEB J* 24, 2762-71.
- Thakur A., Sase M., Lee J.J., Thakur V. & Buchmiller T.L. (2000) Ontogeny of insulin-like growth factor 1 in a rabbit model of growth retardation. *J Surg Res* **91**, 135-40.
- Theys N., Ahn M.T., Bouckenooghe T., Reusens B. & Remacle C. (2011) Maternal malnutrition programs pancreatic islet mitochondrial dysfunction in the adult offspring. *J Nutr Biochem* **22**, 985-94.
- Tobin K.A., Johnsen G.M., Staff A.C. & Duttaroy A.K. (2009) Long-chain polyunsaturated fatty acid transport across human placental choriocarcinoma (BeWo) cells. *Placenta* **30**, 41-7.
- Torano E.G., Garcia M.G., Fernandez-Morera J.L., Nino-Garcia P. & Fernandez A.F. (2016) The Impact of External Factors on the Epigenome: In Utero and over Lifetime. *Biomed Res Int* **2016**, 2568635.
- Tsatsaris V., Fournier T. & Winer N. (2010) Pathophysiologie de la préeclampsie. Ann Fr Anesth Reanim 29, 13-8.
- U.S.EPA (2002) Health assessment document for diesel engine exhaust.
- U.S.EPA (2003) Criteria pollutants metropolitan area trends.
- Valentino S.A., Tarrade A., Aioun J., Mourier E., Richard C., Dahirel M., Rousseau-Ralliard D., Fournier N., Aubriere M.C., Lallemand M.S., Camous S., Guinot M., Charlier M., Aujean E., Al Adhami H., Fokkens P.H., Agier L., Boere J.A., Cassee F.R., Slama R. & Chavatte-Palmer P. (2016)

Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits. *Part Fibre Toxicol* **13**, 39.

- Valery S., Picone O., Coatantiec Y., Frati A., Labrousse C. & Ayoubi J. (2015) Prématurité modérée 34-37 sa : Description des causes et conséquences néonatales immédiates dans une maternité de niveau 2. *Gynecol Obstet Fertil* 43, 582-7.
- van Berlo D., Albrecht C., Knaapen A.M., Cassee F.R., Gerlofs-Nijland M.E., Kooter I.M., Palomero-Gallagher N., Bidmon H.J., van Schooten F.J., Krutmann J. & Schins R.P. (2010) Comparative evaluation of the effects of short-term inhalation exposure to diesel engine exhaust on rat lung and brain. *Arch Toxicol* **84**, 553-62.
- Varastehpour A., Radaelli T., Minium J., Ortega H., Herrera E., Catalano P. & Hauguel-de Mouzon S. (2006) Activation of phospholipase A2 is associated with generation of placental lipid signals and fetal obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 248-55.
- Veenendaal M.V., Painter R.C., de Rooij S.R., Bossuyt P.M., van der Post J.A., Gluckman P.D., Hanson
 M.A. & Roseboom T.J. (2013) Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45
 Dutch famine. *BJOG* 120, 548-53.
- Vehaskari V.M., Aviles D.H. & Manning J. (2001) Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* 59, 238-45.
- Veras M.M., Damaceno-Rodrigues N.R., Caldini E.G., Maciel Ribeiro A.A., Mayhew T.M., Saldiva P.H.
 & Dolhnikoff M. (2008) Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod* 79, 578-84.
- Veras M.M., Damaceno-Rodrigues N.R., Guimaraes Silva R.M., Scoriza J.N., Saldiva P.H., Caldini E.G. & Dolhnikoff M. (2009) Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. *Environ Res* **109**, 536-43.
- Vickers M.H., Gluckman P.D., Coveny A.H., Hofman P.L., Cutfield W.S., Gertler A., Breier B.H. & Harris M. (2005) Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 146, 4211-6.
- Vienneau D., de Hoogh K., Bechle M.J., Beelen R., van Donkelaar A., Martin R.V., Millet D.B., Hoek G.
 & Marshall J.D. (2013) Western European land use regression incorporating satellite- and ground-based measurements of NO2 and PM10. *Environ Sci Technol* 47, 13555-64.
- von Ehrenstein O.S., Aralis H., Cockburn M. & Ritz B. (2014) In Utero Exposure to Toxic Air Pollutants and Risk of Childhood Autism. *Epidemiology* **25**, 851-8.
- Votavova H., Dostalova Merkerova M., Fejglova K., Vasikova A., Krejcik Z., Pastorkova A., Tabashidze N., Topinka J., Veleminsky M., Jr., Sram R.J. & Brdicka R. (2011) Transcriptome alterations in maternal and fetal cells induced by tobacco smoke. *Placenta* **32**, 763-70.
- Votavova H., Dostalova Merkerova M., Krejcik Z., Fejglova K., Vasikova A., Pastorkova A., Tabashidze N., Topinka J., Balascak I., Sram R.J. & Brdicka R. (2012) Deregulation of gene expression induced by environmental tobacco smoke exposure in pregnancy. *Nicotine Tob Res* **14**, 1073-82.
- Wallace J.M., Bourke D.A., Aitken R.P., Leitch N. & Hay W.W., Jr. (2002) Blood flows and nutrient uptakes in growth-restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 282, R1027-36.
- Wallace J.M., Milne J.S., Matsuzaki M. & 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**, 718-24.
- Wan J.B., Huang L.L., Rong R., Tan R., Wang J. & Kang J.X. (2010) Endogenously decreasing tissue n-6/n-3 fatty acid ratio reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting systemic and vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2487-94.

Ward A.J. & Cooper T.A. (2010) The pathobiology of splicing. J Pathol 220, 152-63.

Watanabe N. (2005) Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicol Lett* **155**, 51-8.

- Weidner C., Steinfath M., Opitz E., Oelgeschlager M. & Schonfelder G. (2016) Defining the optimal animal model for translational research using gene set enrichment analysis. *EMBO Mol Med* **8**, 831-8.
- Weldy C.S., Liu Y., Liggitt H.D. & Chin M.T. (2014) In utero exposure to diesel exhaust air pollution promotes adverse intrauterine conditions, resulting in weight gain, altered blood pressure, and increased susceptibility to heart failure in adult mice. *PLoS One* **9**, e88582.
- Westerholm R. & Egeback K.E. (1994) Exhaust emissions from light- and heavy-duty vehicles: chemical composition, impact of exhaust after treatment, and fuel parameters. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 4**, 13-23.
- Whiting N. (2014) Air pollution: 10 countries with the world's dirtiest air. URL <u>http://www.abc.net.au/news/2014-05-08/10-countries-with-the-world's-dirtiest-air/5438872</u>.
- WHO W.H.O. (2006) Air Quality Guidelines Particlate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide
- Wichmann H.E. (2007) Diesel exhaust particles. Inhalation Toxicology 19, 241-4.
- Wick P., Malek A., Manser P., Meili D., Maeder-Althaus X., Diener L., Diener P.A., Zisch A., Krug H.F. & von Mandach U. (2010) Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect* **118**, 432-6.
- Wideroe M., Vik T., Jacobsen G. & Bakketeig L.S. (2003) Does maternal smoking during pregnancy cause childhood overweight? *Paediatric and Perinatal Epidemiology* **17**, 171-9.
- Wilhelm-Benartzi C.S., Houseman E.A., Maccani M.A., Poage G.M., Koestler D.C., Langevin S.M., Gagne L.A., Banister C.E., Padbury J.F. & Marsit C.J. (2012) In Utero Exposures, Infant Growth, and DNA Methylation of Repetitive Elements and Developmentally Related Genes in Human Placenta. *Environmental Health Perspectives* **120**, 296-302.
- Wooding F.B.P. & Flint A.P.F. (1994) Placentation. In: *Marshall's Physiologye of Reproduction* (ed. by Lamming GE), pp. 233-460.
- Woods L.L., Ingelfinger J.R., Nyengaard J.R. & Rasch R. (2001) Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* **49**, 460-7.
- Wu J., Yu C., Tan Y., Hou Z., Li M., Shao F. & Lu X. (2015) Effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on spatial cognition and hippocampal neurodevelopment in rats. *Environ Res* 138, 67-73.
- Xie X., Lin T., Zhang M., Liao L., Yuan G., Gao H., Ning Q. & Luo X. (2015) IUGR with infantile overnutrition programs an insulin-resistant phenotype through DNA methylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha in rats. *Pediatr Res* 77, 625-32.
- Xu Y., Barregard L., Nielsen J., Gudmundsson A., Wierzbicka A., Axmon A., Jonsson B.A., Karedal M. & Albin M. (2013) Effects of diesel exposure on lung function and inflammation biomarkers from airway and peripheral blood of healthy volunteers in a chamber study. *Part Fibre Toxicol* **10**, 60.
- Yajnik C.S. (2003) Nutrition, growth, and body size in relation to insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* **3**, 108-14.
- Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S. & Tsutsumi Y. (2011) Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol* 6, 321-8.
- Yang H., Sun C., Fan Z., Tian X., Yan L., Du L., Liu Y., Chen C., Liang X.J., Anderson G.J., Keelan J.A., Zhao Y. & Nie G. (2012) Effects of gestational age and surface modification on materno-fetal transfer of nanoparticles in murine pregnancy. *Sci Rep* **2**, 847.
- Yllera M.D., Alexandre-Pires G.M. & Cifuentes J.M. (2003) Placenta: Regularization of neovascularization. Microvascularization pattern of the rabbit term placenta. *Microscopy Research and Technique* **60**, 38-45.
- Yokota S., Mizuo K., Moriya N., Oshio S., Sugawara I. & Takeda K. (2009) Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neurosci Lett* **449**, 38-41.
- Yokota S., Moriya N., Iwata M., Umezawa M., Oshio S. & Takeda K. (2013) Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. *J Toxicol Sci* **38**, 13-23.
- Yokota S., Sato A., Umezawa M., Oshio S. & Takeda K. (2015) In utero exposure of mice to diesel exhaust particles affects spatial learning and memory with reduced N-methyl-D-aspartate receptor expression in the hippocampus of male offspring. *Neurotoxicology* **50**, 108-15.
- Yoshida S., Hiyoshi K., Oshio S., Takano H., Takeda K. & Ichinose T. (2010) Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring. *Fertil Steril* **93**, 1695-9.
- Yoshizaki K., Brito J.M., Moriya H.T., Toledo A.C., Ferzilan S., de Oliveira A.P.L., Machado I.D., Farsky S.H.P., Silva L.F.F., Martins M.A., Saldiva P.H.N., Mauad T. & Macchione M. (2015) Chronic exposure of diesel exhaust particles induces alveolar enlargement in mice. *Respiratory Research* **16**.
- Yu W.J., Son J.M., Lee J., Kim S.H., Lee I.C., Baek H.S., Shin I.S., Moon C., Kim S.H. & Kim J.C. (2014) Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Nanotoxicology* **8 Suppl 1**, 85-91.
- Zhang X.F., Park J.H., Choi Y.J., Kang M.H., Gurunathan S. & Kim J.H. (2015) Silver nanoparticles cause complications in pregnant mice. *Int J Nanomedicine* **10**, 7057-71.
- Zielinska B., Sagebiel J., Arnott W.P., Rogers C.F., Kelly K.E., Wagner D.A., Lighty J.S., Sarofim A.F. & Palmer G. (2004) Phase and size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel and gasoline vehicle emissions. *Environ Sci Technol* **38**, 2557-67.



Titre : Effets multigénérationnels d'une exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel pendant la gestation sur le développement fœto-placentaire dans un modèle lapin

Mots clés : Placenta, gaz d'échappement diesel, intergénérationnel, lapin

Résumé: La pollution atmosphérique est un problème de santé publique majeur responsable en 2012 de 3,7 millions de décès prématurés dans le monde. La pollution de l'air, au même titre que les autres facteurs environnementaux (e.g., nutrition, stress) auxquels sont exposées les femmes enceintes, pourrait avoir un impact sur le développement fœtal. L'objectif de ce travail était d'étudier les effets d'une exposition gestationnelle aux gaz d'échappement de moteur diesel, source majeure de la pollution atmosphérique, sur le développement fœtoplacentaire en première (F1) et deuxième (F2) génération. Des lapines gestantes (F0) ont été exposées 2h/jour du 3° au 27° jour post-conception (jpc) à des niveaux de gaz d'échappement de moteur diesel mimant un pic de pollution aux particules fines de grandes villes européennes. L'exposition gestationnelle des lapines F0 entrainait des signes d'hypotrophie fœtale (réduction de la longueur de la tête, de l'efficacité placentaire et hypoinsulinémie des fœtus F1 à 28jpc) associés à un défaut de vascularisation placentaire et des dérégulations fonctionnelles du placenta identifiées par une analyse d'enrichissement de réseaux de gènes (GSEA) sur des données de transcriptomique (microarray dédié). Le transfert transplacentaire des nanoparticules inhalées a été démontré par microscopie électronique à transmission. En F2, la concentration plasmatique en triglycérides était réduite et la concentration plasmatique en cholestérol augmentée chez les fœtus issus des lapines F1 exposées in utero. La biométrie fœto-placentaire et la structure du placenta n'ont pas été affectées. Les analyses GSEA du transcriptome placentaire F2 ont révélé des perturbations de réseaux de gènes impliqués dans la formation du protéasome et des exosomes et dans l'inflammation. Les modulations de profils en acides gras au niveau placentaire et fœtal suggèrent la mise en place de mécanismes adaptatifs anti-inflammatoires chez les F2. En conclusion, l'exposition gestationnelle chronique à des gaz d'échappement de moteur diesel induit des perturbations fœto-placentaires sur plusieurs générations. Ces données ont mis en évidence le risque lié aux nanoparticules émises par les moteurs diesel et qui ne sont soumises actuellement à aucune réglementation.

Title: Multigenerational effects of maternal exposure to diesel engine exhaust during gestation on feto-placental development in rabbits

Keywords: Placenta, diesel exhaust, intergenerational, rabbit

Abstract: Atmospheric pollution is a major threat for human health, causing 3.7 million premature deaths worldwide in 2012. Air pollution, as well as other environmental factors (e.g., nutrition, stress) faced by pregnant women may affect fetal development. The objective of this work was to study the impact of gestational exposure to diesel engine exhaust (DE), a major source of air pollution, on the fetoplacental development in the first (F1) and second (F2) generation. Pregnant rabbits (F0) were exposed 2h/day from 3 to 27 days post-conception (dpc) at DE levels mimicking a pollution peak in major European cities. Gestational exposure of F0 females induced signs of fetal hypotrophia (reduced head length, placental efficiency and hypoinsulinemia in fetuses at 28 dpc) associated with placental vasculature failure and placental functional deregulations identified by gene set enrichment analysis (GSEA) on transcriptomic data (dedicated microarray). Transplacental transfer of inhaled nanoparticles was demonstrated by transmission electronic microscopy. In F2 generation, plasma triglyceride concentrations were reduced and plasma cholesterol concentration increased in fetuses of in utero exposed F1 rabbits. Placental biometry and structure were not affected. GSEA analysis of F2 placental transcriptome revealed disturbances in gene networks involved in formation of proteaome and exosome, in inflammation. Modulations of placental and fetal fatty acid profiles suggest anti-inflammatory adaptive mechanisms in F2 fetuses. In conclusion, chronic gestational exposure to diesel engine exhaust affects fetoplacental development over several generations. These data highlight health hazards caused by DE nanoparticles and currently not subject to regulation.